

Déterminants de la distribution subcellulaire et tissulaire de médicaments cationiques lysosomotropiques et leur effet antiprolifératif

Mémoire

Alexandre Parks

Maîtrise en médecine expérimentale Maître ès sciences (M.Sc.)

Québec, Canada

© Alexandre Parks, 2016

<u>RÉSUMÉ</u>

La concentration des médicaments cationiques dans les compartiments acides de la cellule est bien connue. Nous avons tenté d'expliquer davantage certains aspects encore inconnus au sujet de cette réaction cellulaire. En premier lieu, nous avons étudié l'accumulation subcellulaire et in vivo d'un médicament cationique fluorescent, la guinacrine, dans un modèle murin. L'accumulation cellulaire de la quinacrine dans les fibroblastes dermigues de souris induisait une inhibition du flux autophagique, ainsi qu'une lysosomogénèse. L'administration de la quinacrine in vivo démontrait une distribution hétérogène et une augmentation autophagique et lysosomale dans les poumons. En deuxième lieu, l'effet cytostatique et cytotoxique d'une série de médicaments cationiques lysosomotropiques furent étudiés dans une série de lignées cellulaires. Une série de 6 triéthylamines substituées furent choisies afin d'étudier davantage l'effet cytostatique de l'ion trapping. L'accumulation du marqueur autophagique LC3 II, le marqueur apoptotique PARP1, la cytotoxicité, le cycle cellulaire et la fonction endocytose furent étudiés plus en détails dans la lignée tumorale U937. Chacun des médicaments cationiques démontrait un effet antiprolifératif significatif, mais aucun signe de cytotoxicité n'était observé à certains niveaux de concentrations. Un cotraitement avec les inhibiteurs de cholestérol, βcyclodextrine et lovastatine, renversait partiellement l'effet antiprolifératif des amines. L'intensité de l'effet antiprolifératif induit par les médicaments cationiques est clairement prédite par leur puissance de l'inhibition du flux autophagique et par la liposolubilité. L'accumulation tissulaire de la quinacrine et l'effet cytostatique prédit par l'inhibition du flux autophagique et par la liposolubilité des amines substituées offre des possibilités d'application dans le domaine de l'oncologie et de la pharmacocinétique des nombreux médicaments concernés.

TABLE DES MATIÈRES

| RÉSUMÉ | iii |
|--|----------|
| TABLE DES MATIÈRES | v |
| LISTE DES FIGURES | vii |
| ABRÉVIATIONS | xi |
| REMERCIEMENTS | xv |
| INTRODUCTION | 1 |
| 1. La vacuolisation cellulaire | 1 |
| 1.1 Historique et induction | 1 |
| 1.2 Pompe V-ATPase | 2 |
| 1.2.1 Structure et sous-unités | 2 |
| 1.2.2 Localisation et fonctions | 4 |
| 1.2.3 Les inhibiteurs | 5 |
| 1.3 Vacuolisation in vivo et connaissances actuelles | 6 |
| 1.3.1 Démonstration <i>in vivo</i> | 7 |
| 1.3.2 Synthèse actuelle de la cytopathologie causée par la séquestration des cations | 8 |
| 2. Médicaments cationiques lysosomotropiques | 12 |
| 2.1 Procainamide | 12 |
| 2.2 Lidocaîne | 13 |
| 2.3 Hydroxychloroquine | 14 |
| 2.5 Quinacrine | 17 |
| 2.6 Amiodarone | 19 |
| 3. Autophagie | 21 |
| 3.1 Historique | 21 |
| 3.2 Biologie moléculaire | 22 |
| 3.3 Fonctions | 24 |
| 3.4 Autophagie et le cancer | 25 |
| 3.5 Autophagie et cholestérol | |
| 4. Phospholipidose | |
| 5. Objectifs du projet de recherche | |
| | |
| MATERIEL ET METHODES | 31 |
| 1. Inhibition du flux autophagique et lysosomogénèse à la suite de la | |
| sequestration du medicament cationique la quinacrine dans un modele murin | 31 |
| | 31 |
| 1.1.1 Cellules et animaux | 31 |
| 1.1.2 Agents pharmacologiques | ວ∠ ຊຊ |
| 1.2 Máthodes | 33 |
| 1.2 Methodes 1.2.1 Transfection et vecteurs | 33 |
| 1.2.2 Microscopie | 34 |
| 1.2.3 Transport cellulaire | 35 |
| 1.2.4 Immunobuvardage | 37 |
| 1.2.5 Isolation de l'ARN | 38 |
| 1.2.6 PCR quantitative | 39 |
| 1.2./ Analyses statistiques | 40 |

| 2. L'effet cytostatique et cytotoxique des medicaments cationiques | |
|---|--|
| lysosomotropiques : rôle de la liposolubilité et du flux autophagique et effet de |) |
| l'ablation du cholesterol | 41 |
| 2.1 Materiel | 41 |
| 2.1.1 Culture cellulaire | 41 |
| 2.1.2 Produits pharmacologiques | 42 |
| 2.2 Methodes | 42 |
| 2.2.2 MICIOSCOPIE | 43 11 |
| 2.2.3 Oytometrie en lidx (1 AOO) | 45 |
| 2.2.5 Détermination du cholestérol chez les cellules U937 | 47 |
| 2.2.6 Analyses statistiques | 47 |
| RÉSULTATS | 49 |
| 1. Inhibition du flux autophagique et de la lysosomogénèse à la suite de la | |
| séguestration du médicament cationique guinacrine dans un modèle murin | 49 |
| 1.1 Transport de la guinacrine dans les fibroblastes de souris | 49 |
| 1.2 Accumulation autophagique chez les fibroblastes dermigues de souris | |
| traités avec la quinacrine | 56 |
| 1 3 La lysosomodénèse chez les fibroblastes dermiques de souris traités a | vec |
| | 030 |
| 1 4 La distribution tissulaire de la quinacrine chez la souris | 00 |
| 1.5 Expériences supplémentaires avec les cellules HEK 203a | 00 |
| 2 L'effet cytostatique et cytotoxique des médicaments cationiques | 70 |
| 2. L'ener cytostatique et cytotoxique des medicaments cationiques | - |
| IVSOSOMOTRODIQUES : ROLE DE LA ILDOSOLUDILITE ET QUITIUX AUTODINACIQUE ET ETTET DE | 2 |
| l'ablation du cholestérol | e 75 |
| l'ablation du cholestérol | 75 75 |
| l'ablation du cholestérol | 75 75 77 |
| l'ablation du cholestérol 2.1 Modèles cellulaires 2.2 L'effet des s-Et3N sur la prolifération cellulaire 2.3 Transport des médicaments cationiques et l'autophagie chez les cellule | 75 75 77 |
| l'ablation du cholestérol | • 75 75 77 :s 85 |
| I'ablation du cholestérol 2.1 Modèles cellulaires 2.2 L'effet des s-Et3N sur la prolifération cellulaire 2.3 Transport des médicaments cationiques et l'autophagie chez les cellule U937 traitées aux s-Et3N 2 4 Réponses tardives à la suite de traitements aux s-Et3N chez les cellule | • 75 75 77 •s 85 |
| I'ablation du cholestérol 2.1 Modèles cellulaires 2.2 L'effet des s-Et3N sur la prolifération cellulaire 2.3 Transport des médicaments cationiques et l'autophagie chez les cellule U937 traitées aux s-Et3N 2.4 Réponses tardives à la suite de traitements aux s-Et3N chez les cellule U937 | • 75 75 77 S 85 S 89 |
| I'ablation du cholestérol | • 75 77 •s 85 ·s 89 |
| I'ablation du cholestérol 2.1 Modèles cellulaires. 2.2 L'effet des s-Et3N sur la prolifération cellulaire 2.3 Transport des médicaments cationiques et l'autophagie chez les cellule U937 traitées aux s-Et3N 2.4 Réponses tardives à la suite de traitements aux s-Et3N chez les cellule U937. 2.5 Réversibilité de l'effet antiprolifératif des amines par des agents qui interfèrent avec le réseau de signalisation du mévalonate conduisant à la | 75 75 77 85 85 89 |
| I'ablation du cholestérol 2.1 Modèles cellulaires 2.2 L'effet des s-Et3N sur la prolifération cellulaire 2.3 Transport des médicaments cationiques et l'autophagie chez les cellule U937 traitées aux s-Et3N 2.4 Réponses tardives à la suite de traitements aux s-Et3N chez les cellule U937 U937 2.5 Réversibilité de l'effet antiprolifératif des amines par des agents qui interfèrent avec le réseau de signalisation du mévalonate conduisant à la synthèse du cholestérol et à la prénvlation des protéines | • 75 77 85 85 s 89 |
| l'ablation du cholestérol 2.1 Modèles cellulaires 2.2 L'effet des s-Et3N sur la prolifération cellulaire 2.3 Transport des médicaments cationiques et l'autophagie chez les cellule U937 traitées aux s-Et3N 2.4 Réponses tardives à la suite de traitements aux s-Et3N chez les cellule U937 U937 2.5 Réversibilité de l'effet antiprolifératif des amines par des agents qui interfèrent avec le réseau de signalisation du mévalonate conduisant à la synthèse du cholestérol et à la prénylation des protéines | 75 75 77 85 85 89 93 |
| I'ablation du cholestérol 2.1 Modèles cellulaires 2.2 L'effet des s-Et3N sur la prolifération cellulaire 2.3 Transport des médicaments cationiques et l'autophagie chez les cellule U937 traitées aux s-Et3N 2.4 Réponses tardives à la suite de traitements aux s-Et3N chez les cellule U937 2.5 Réversibilité de l'effet antiprolifératif des amines par des agents qui interfèrent avec le réseau de signalisation du mévalonate conduisant à la synthèse du cholestérol et à la prénylation des protéines | 75 75 77 85 85 89 89 |
| I'ablation du cholestérol 2.1 Modèles cellulaires 2.2 L'effet des s-Et3N sur la prolifération cellulaire 2.3 Transport des médicaments cationiques et l'autophagie chez les cellule U937 traitées aux s-Et3N 2.4 Réponses tardives à la suite de traitements aux s-Et3N chez les cellule U937 2.5 Réversibilité de l'effet antiprolifératif des amines par des agents qui interfèrent avec le réseau de signalisation du mévalonate conduisant à la synthèse du cholestérol et à la prénylation des protéines DISCUSSION 1. Les médicaments cationiques lysosomotropiques et la bafilomycine A1 | • 75 77 •s 85 •s 89 93 102 102 |
| Iysosomotropiques : role de la liposolubilité et du flux autophagique et effet de l'ablation du cholestérol | |
| Iysosomotropiques : role de la liposolubilité et du flux autophagique et effet de l'ablation du cholestérol | |
| Iysosomotropiques : role de la liposolubilité et du flux autophagique et effet de l'ablation du cholestérol | |
| Iysosomotropiques : role de la liposolubilité et du flux autophagique et enet de l'ablation du cholestérol | a 75 77 85 89 93 102 .102 .104 .104 .105 .106 |
| Iysosomotropiques : role de la liposolubilité et du flux autophagique et erret de l'ablation du cholestérol | |
| Iysosomotropiques : role de la liposolubilite et du flux autophagique et erret de l'ablation du cholestérol | |
| I'ablation du cholestérol 2.1 Modèles cellulaires 2.2 L'effet des s-Et3N sur la prolifération cellulaire 2.3 Transport des médicaments cationiques et l'autophagie chez les cellule U937 traitées aux s-Et3N 2.4 Réponses tardives à la suite de traitements aux s-Et3N chez les cellule U937. 2.5 Réversibilité de l'effet antiprolifératif des amines par des agents qui interfèrent avec le réseau de signalisation du mévalonate conduisant à la synthèse du cholestérol et à la prénylation des protéines DISCUSSION 1. Les médicaments cationiques lysosomotropiques et la bafilomycine A1. 2. Transporteurs membranaires 3. Flux autophagique 4. Lysosomogénèse 5. Effet antiprolifératif des amines 7. Transferrine. 8. Essais supplémentaires (cycle cellulaire, apoptose et cytotoxicité). 9. Expériences in vivo | |
| Iysosomotropiques : role de la liposolubilité et du flux autophagique et effet de l'ablation du cholestérol | |

LISTE DES FIGURES

| FIGURE 1 : La pompe V-ATPase (Forgac, 2007) | 3 |
|---|---------|
| FIGURE 2 : Structure de la procainamide | 12 |
| FIGURE 3 : Structure de la lidocaïne | 13 |
| FIGURE 4 : Structure de l'hydroxychloroquine | 15 |
| FIGURE 5 : Structure de la chloroquine | 16 |
| FIGURE 6 : Structure de la quinacrine | 17 |
| FIGURE 7 : Structure de l'amiodarone | 19 |
| FIGURE 8 : Schéma simplifié du processus autophagique. (Melendez et Levin | е., |
| 2005) | 21 |
| FIGURE 9 : Démonstration microscopique de l'accumulation de la quinacrine o | lans |
| les fibroblastes dermiques de souris | 50 |
| FIGURE 10 : Étude de la localisation de marqueurs à fluorescence rouge avec | ; la |
| quinacrine dans les fibroblastes dermiques de souris | 52 |
| FIGURE 11 : Accumulation de la quinacrine dans les fibroblastes dermiques de | е |
| souris mesurée par sa fluorescence intrinsèque. | 53 |
| FIGURE 12 : Effet d'agents inhibiteurs sur l'accumulation de la quinacrine dans | s les |
| fibroblastes dermiques de souris. | 55 |
| FIGURE 13 : Effet de l'inhibiteur autophagique, spautin-1, sur le transport de la | £ |
| quinacrine dans les fibroblastes dermiques de souris | 57 |
| FIGURE 14 : Caractérisation de l'autophagie induite par l'accumulation de la | |
| quinacrine dans les fibroblastes dermiques de souris | |
| comparativement a d'autres traitements | 59 |
| FIGURE 15 : Presence de lysosomogenese demontree par immunobuvardage | ; |
| | IS |
| avec la quinacrine. | 61 |
| FIGURE 16 : Determination par RT-PCR des niveaux d'ARNIN des proteines | |
| LAMPT et LAMPZ dans les indicidastes deriniques de sours à la | |
| sulle de traitements par la quinachine ou par le sevrage de serun | ו 62 |
| FIGURE 17 : Activité enzymatique de la cathensine D dans les fibroblastes | 02 |
| dermiques de souris | 64 |
| FIGURE 18 · Tropisme de la quinacrine pour les poumons de souris | |
| FIGURE 19 : Détermination de la guinacrine par fluorescence dans les organe | s de |
| souris à la suite de traitements avec la guinacrine ou la saline in | vivo |
| (40 mg/kg/iour i.p. pour 2 jours). | 68 |
| FIGURE 20 : Réponses in vivo aux traitements avec la guinacrine des margue | urs |
| de l'autophagie et de la lysosomogénèse démontrées par | |
| immunobuvardages des extraits de poumons de souris | 69 |
| FIGURE 21 : Démonstration de la fluorescence de la quinacrine dans les cellu | les |
| HEK 293a | 70 |
| FIGURE 22 : Transport de la quinacrine chez les cellules HEK 293a | 71 |
| FIGURE 23 : Validation de l'expression transitoire des OCTs fusionnés avec m | ιус |
| dans les cellules HEK 293a. | 73 |
| FIGURE 24 : Transport de la quinacrine dans les cellules HEK 293a | 74 |

| FIGURE 2 | 25 : Expression de protéines spécifiques chez 4 lignées cellulaires sans traitements 76 |
|----------|--|
| FIGURE 2 | 26 : Effet des médicaments triéthylamines substitués (s-Et ₃ N) sur la |
| FIGURE 2 | 27 : Corrélation entre les valeurs antiprolifératives Cl₅₀ des 6 s-Et₃N de la série chez les 4 lignées cellulaires et leur lipophilicité, exprimée en logP. |
| FIGURE 2 | 28 : Analyse du cycle cellulaire basée sur la détermination par cytofluorométrie du Hoechst 33342 dans les cellules U937 traitées avec les s-Et₃N pour une durée de 48 h. |
| FIGURE 2 | 29 : Analyse du cycle cellulaire basée sur la détermination par cytofluorométrie du Hoechst 33342 dans les HUVECs traitées avec les s-Et₃N pour une durée de 48 h |
| FIGURE 3 | Démonstration du niveau de phosphorylation du pRB chez les cellules U937 traitées pour une durée de 48 h avec des médicaments s-Et₃N sélectionnés. |
| FIGURE 3 | S1 : Démonstration du niveau de phosphorylation du pRB chez les HUVEC traitées pour une durée de 48 h avec des médicaments s- Et ₃ N sélectionnés |
| FIGURE 3 | 12 : Mécanisme de la séquestration de la quinacrine chez les cellules U937 |
| FIGURE 3 | 3 : Immunobuvardages des extraits de cellules U937 traitées avec les médicaments s-Et ₃ N pour la protéine LC3 |
| FIGURE 3 | 34 : Prédiction de l'effet antiprolifératif des médicaments s-Et ₃ N par l'accumulation de la protéine LC3 II 88 |
| FIGURE 3 | 5 : Viabilité des cellules U937 estimée par détermination cytofluorométrique de capture de DRAQ7 |
| FIGURE 3 | 6: Clivage de PARP1 à la suite de traitements de 24 h avec les médicaments s-Et ₃ N chez les cellules U93792 |
| FIGURE 3 | 87 : Renversement partiel de l'effet antiprolifératif des s-Et ₃ N par des cotraitements avec la β-cyclodextrine (1 mM) chez les cellules U937 |
| FIGURE 3 | 18 : Renversement partiel de l'effet antiprolifératif des s-Et ₃ N par des cotraitements avec la lovastatine (100 nM) chez les cellules U93795 |
| FIGURE 3 | SP: Absence du renversement de l'effet antiprolifératif des médicaments s-Et₃N par le géranylgéranyl-pyrophosphate (GGPP) chez les cellules U93796 |
| FIGURE 4 | 10 : Détermination par cytofluorométrie du transport de la quinacrine avec des cotraitements optionnels de β-cyclodextrine ou lovastatine97 |
| FIGURE 4 | I1 : Effet de cotraitements avec la β-cyclodextrine ou lovastatine sur l'accumulation de LC3 |
| FIGURE 4 | Effet des interventions pharmacologiques (48 h) sur le contenu de cholestérol des cellules U937 |
| FIGURE 4 | I3 : Accumulation de la transferrine marquée avec l'AlexaFluor-594 chez les cellules U937 traitées avec les médicaments s-Et₃N avec des cotraitements optionnels de la β-cyclodextrine (1 mM) pour 24 h (détermination cytofluorométrique avec la fluorescence rouge) 101 |

| FIGURE 44 : Schéma des réponses cellulaires à la suite de traitemen | ts avec les s- |
|---|----------------|
| Et ₃ N | |
| FIGURE 45 : Schéma des réponses cellulaires à la suite de traitemen | t avec la |
| guinacrine | |
| • | |

ABRÉVIATIONS

| C° | Degré Celsius |
|--|---|
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| ADNc | Acide désoxyribonucléique |
| | complémentaire |
| ADP | Adénosine diphosphate |
| AMPK | Adénosine monophosphate-activated |
| | protein kinase |
| ANOVA | Analyse de la variance |
| ARN | Acide ribonucléique |
| ARNm | Acide ribonucléique messager |
| Atg | Autophagy-related |
| ATP | Adénosine triphosphate |
| CDC | Centers for Disease Control and |
| | Prevention |
| CI ₅₀ (<i>IC</i> ₅₀) | Concentration inhibitrice médiane |
| CO ₂ | Dioxyde de carbone |
| CQ | Chloroquine |
| DMAE | 2-diméthylaminoéthanol |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| dNTP | Mélange des quatre désoxyribonucléotides |
| EDTA | Ethylenediaminetetraacetic acid; Éthylène |
| | Diamine Tétra-Acétique |
| EGM | Endothelial Cell Growth Medium |
| Em | Émission |
| EMEM | Eagle's Minimal Essential Medium |
| EMLA | Eutectic Mixture of Local Anesthetics |
| ER-RFP | Endoplasmic reticulum-Red Fluorescent |
| | Protein |
| Et ₃ N | Triéthylamine |
| Ex | Excitation |
| FBS | Foetal Bovine Serum; sérum de veau |
| | foetal |
| FDA | Agence américaine des produits |
| | alimentaires et médicamenteux |
| FDS | Fibroblastes dermiques de souris |
| GAPDH | Glycéraldéhyde 3-phosphate |
| | déhydrogénase |
| GFP | Green Fluorescent Protein; protéine |
| | fluorescente verte |
| h | Heure |
| HBSS | Hank's Balanced Salt Solution |
| HCQ | Hydroxychloroquine |
| Hek293a | Homo sapiens Embryonic Kidney Cells |
| | 293a |

| HEPES | Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine |
|---------------------------------|--|
| НОО | Perovyde de raifort |
| | Human Limbilian Vain Endathalial Calles |
| HUVEC | Auman Umbilical vein Endolnenal Cells, |
| | cellules endothellales de veine du cordon |
| kDe | |
| kDa | KiloDalton |
| kg | Kilogramme |
| | KNOCKOUT |
| LAMP1/2 | Lysosome-associated membrane |
| 1.00 | giycoprotein |
| LU3 | Microtubule-associated protein light chain |
| | 3 |
| MDCK | Madin-Darby canine kidney |
| mg | Milligramme |
| ml | Millilitre |
| mm | Millimètre |
| mM | Millimolaire |
| MPP+ | 1-méthyl-4-phénylpyridinium |
| mTOR | Mammaliam target of rapamycin |
| Ν | Normal |
| Na ₃ VO ₄ | Orthovanadate de sodium |
| NaCl | Chlorure de sodium |
| NaOH | Hydroxyde de sodiuµ |
| nm | Nanomètre |
| nM | Nanomolaire |
| ng | Nanogramme |
| OATP | Organic anion-transporting polypeptide |
| OCT | Organic cation transporter |
| OCTN | Organic zwitterions/cations transporters |
| PARP1 | Poly (ADP-ribose) polymérase 1 |
| PBS | Phosphate buffered saline; Tampon |
| | phosphate salin |
| PCR | Polymerase chain reaction; Réaction en |
| | chaîne par polymérase |
| PEI | Polyéthylènimine |
| phospho-pRB | Retinoblastoma protein phosphorylated; |
| | Protéine phosphorvlée du rétinoblastome |
| PGP | P alvcoprotein: Glycoprotéine P |
| PMNL | Polymorphonuclear leukocytes: |
| | Leucocytes polymorphonucléaires |
| pRB | Retinoblastoma protein: Protéine du |
| P | rétinoblastome |
| PVDF | Polvvinvlidene difluoride: Polvfluorure de |
| | vinvlidène |
| ОХ | Quinacrine |
| s-Et3N | Triéthylamine substituée |
| · | |

| SDS | Sodium dodecyl sulfate; Dodécylsulfate de sodium |
|----------|--|
| SDS-PAGE | Électrophorèse en gel de polyacrylamide avec du laurylsulfate de sodium |
| SNARE | Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment Protein Receptor |
| TFEB | Facteur de transcription ÉB |
| TLR | Toll-like receptor; Réceptor de type Toll |
| Tris | Trishydroxyméthylaminométhane |
| U937 | Cellules leucémiques monocytaires |
| | humaines |
| UVRAG | UV radiation resistance-associated gene |
| V-ATPase | Vacuolar-type H ⁺ -ATPse; Adénosine |
| | triphosphatase vacuolaire |
| WIPI2 | WD repeat domain phosphoinositide- |
| | interacting protein 2 |
| XMEA | X-linked myopathy with excessive |
| | autophagy; Myopathie avec une |
| | autophagie excessive liée au chromosome |
| | X |
| hd | Microgramme |
| μ | Microlitre |
| μM | Micromolaire |

REMERCIEMENTS

Premièrement, je souhaite remercier mon directeur de recherche, le Dr François Marceau, de m'avoir permis de poursuivre mes études graduées au sein de son laboratoire. Je le remercie aussi de m'avoir donné de la confiance tout au long de mon parcours ainsi de me disperser ses nombreux conseils en recherche. Je souhaite le remercier de son introduction au monde de la pharmacologie.

De plus, j'aimerais remercier tous les membres de l'équipe du Dr François Marceau avec lesquels j'ai eu la chance de partager mon séjour au sein du laboratoire. Je dois un remerciement énorme à Mme Johanne Bouthillier pour sa sagesse, son partage de son sens d'organisation et sa gestion du temps et surtout de sa patience. Elle était toujours là pour me donner un coup de main lors de mes nombreuses expériences, mais aussi pour me donner des conseils de vie. J'aimerais remercier les étudiants diplômés avec qui j'ai eu l'honneur de partager mon temps lors de mes études de maitrise. L'étudiant au doctorat, Xavier Charest-Morin, a agi comme un mentor et m'a présenté la vie d'un étudiant diplômé dans un laboratoire de pharmacologie. Il m'a introduit au monde de la biologie moléculaire et il m'a dispensé de nombreux conseils. L'étudiante à la maitrise, Mélissa Jean, était toujours là pour me consoler, partager des moments humoristiques, mais surtout, elle était là lorsque j'avais besoin d'une amie.

INTRODUCTION

1. La vacuolisation cellulaire

La vacuolisation cellulaire est un processus biologique observé chez une panoplie de cellules et d'organismes, des cellules végétales aux cellules de mammifères. Elle est définie comme l'accumulation excessive de vacuoles cytosoliques. Cette accumulation peut être causée à la suite de différents stimuli cellulaires. Un de ces stimuli qui provoque la vacuolisation est l'administration de médicaments cationiques basiques (Henics et Wheatley, 1999). Le traitement des cellules par ce type de médicaments induit une vacuolisation et engendre des réponses physiologiques et cellulaires importantes, mais peu connues. Ce mémoire tentera d'expliquer certaines de ces réponses cellulaires afin d'améliorer et d'approfondir nos connaissances au sujet de la vacuolisation cellulaire. Une connaissance de la vacuolisation cellulaire et de ses réponses cellulaires seraient essentielles dans les nombreux domaines de la santé, de la pharmacologie et permettrait aussi d'améliorer les plans de traitements des patients traités avec des médicaments cationiques.

1.1 Historique et induction

L'observation et l'étude de la vacuolisation cellulaire sont anciennes. Les vacuoles cytosoliques sont géantes et sont observées sous une lumière microscopique blanche. Une des premières identifications de cette cytopathologie fut faite 1943 par l'équipe du Dr H. Lettré et M.Z. Albrecht (Yang et coll., 1965). Depuis leur première observation, il y eut plusieurs manuscrits publiés avec de nombreuses expériences variées qui tentent d'expliquer cette cytopathologie. Une grande variété de types cellulaires et de médicaments cationiques basiques furent utilisés afin de démontrer les réponses cellulaires provenant de la vacuolisation après des traitements avec des amines.

La cytopathologie causée par la séquestration des cations est une réaction résultante du traitement par un médicament cationique, qui est indépendant de son action pharmacologique ciblée. Il fut démontré que ces médicaments cationiques s'accumulaient dans les organelles acides de la cellule (De Duve et coll., 1974). Le rapport de la concentration des médicaments cationiques utilisés par De Duve était égal au ratio de la concentration des protons H⁺ dans les organelles acides par rapport au liquide extracellulaire. Une hypothèse générale a été avancée afin de tenter d'expliquer ce mécanisme de vacuolisation cellulaire. Cette dernière serait la réponse cellulaire à la suite de la séquestration cationique des médicaments cationiques dans les régions lysosomales de la cellule. Poole et coll. (1977) expliquent que les médicaments cationiques traverseraient les membranes cellulaires sous forme neutre avant d'être séquestrés et protonés dans les régions acides de la cellule, dont les lysosomes, pour finalement induire la vacuolisation par appel osmotique d'eau.

1.2 Pompe V-ATPase

Moriyama (1996) proposa une hypothèse d'énergisation qui correspond au gradient de protons présent dans les organelles acides de la cellule et cette hypothèse dépend de la pompe à protons vacuolaire-ATPase (V-ATPase). Il démontra que la capture et la rétention des médicaments radioactifs, la chlorpromazine, l'halopéridol et le propranolol, dans des granules chromaffines étaient médiées par la pompe V-ATPase en présence d'ATP.

1.2.1 Structure et sous-unités

La pompe à protons V-ATPase comprend plusieurs sous-unités fonctionnelles. Cette pompe est formée d'un ensemble de 13 sous-unités regroupées en deux domaines protéiques, les domaines V₀ et V₁. Le domaine V₀ inséré dans la



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

FIGURE 1 : La pompe V-ATPase (Forgac, 2007)

membrane de l'organelle acide a un poids moléculaire d'environ 260 kDa. Cette région de la pompe permet la translocation des protons vers l'intérieur de l'organelle acide après l'hydrolyse de la molécule d'ATP par le second domaine protéique ; V₁. Ce dernier est situé dans le cytoplasme de la cellule et à un poids moléculaire approximatif de 650 kDa (Forgac, 2007).

Le domaine protéique V₁ est essentiel pour l'hydrolyse de l'ATP. Il comprend 8 sous-unités (A à H). Les sous-unités D et F de ce domaine protéique forment l'axe de rotor central (Kitagawa et coll., 2008). L'hydrolyse de la molécule d'ATP a lieu au site catalytique de liaison des nucléotides de la sous-unité A qui provoque une rotation de l'axe de rotor central. La structure complexe de cette pompe fut étudiée en profondeur chez *Manduca sexta* et chez la levure par Muench (2009), Diepholz (2008) et Zhang (2008). L'hydrolyse de l'ATP au site catalytique des sous-unités AB provoque la rotation de l'axe rotor central qui permet la rotation des sous-unités c qui à son tour permet le transport des protons à travers la membrane.

Le domaine protéique V₀ comprend 6 sous-unités, dont a, d, c, c', c'' et e. Ce domaine dans la pompe V-ATPase des mammifères comprend des formes

isométriques spécifiques à certains tissus, des sous-unités a et d, pendant que la pompe V-ATPase de la levure comprend deux isoformes de la sous-unité a spécifique aux organelles, dont l'isoforme V_{ph1p} et S_{tv1p} . La rotation ancrée dans ce domaine de la pompe permet le transport des protons contre le gradient de concentration d'une part et d'autres de la membrane parallèlement avec l'hydrolyse de l'ATP par le domaine V₁.

1.2.2 Localisation et fonctions

La pompe V-ATPase se situe dans la membrane des différentes organelles acides de la cellule ainsi dans certaines membranes plasmiques de cellules spécifiques. Les compartiments acides en question sont les endosomes, les lysosomes, le transGolgi et les vésicules sécrétrices. La pompe est donc étroitement reliée au transport des protons de ces compartiments acides et parallèlement au transport des médicaments cationiques (Sun-Wada et coll., 2004).

La pompe V-ATPase joue aussi un rôle dans certaines pathologies humaines, dont l'ostéoporose, l'acidose d'origine tubulaire rénale et la pathologie myopathie avec une autophagie excessive. Approximativement 50% des patients atteints d'une ostéoporose maligne infantile de transmission autosomale récessive démontraient des mutations dans la sous-unité isoforme a3 de la pompe (Frattini et coll., 2000 ; Kornak et coll., 2000 ; Sobacchi et coll., 2001). Chez les ostéoclastes humains, il y a approximativement 26 mutations identifiées chez la sous-unité a3 de la pompe V-ATPase

Cette pompe est aussi impliquée dans la pathologie de l'acidose tubulaire rénale. Cette condition médicale est causée par l'accumulation d'acide dans l'organisme dû à l'incapacité de la fonction rénale d'acidifier adéquatement l'urine (Laing et coll., 2005). Il existe quelques catégories de cette condition, mais l'acidose rénale liée aux tubules distaux est celle où la pompe V-ATPase joue un rôle important. Approximativement 12 mutations dans l'isoforme de la sous-unité B1 (Stover et coll.,

4

2002) et 24 mutations de la sous-unité a4 peuvent causer l'acidose rénale des tubules distaux (Karet et coll., 1999 ; Smith et coll., 2000 ; Stover et coll., 2002).

La myopathie avec une autophagie excessive liée au chromosome X (XMEA) est une condition pédiatrique rare qui est caractérisée par une vacuolisation lente et progressive avec le développement d'une atrophie musculaire. C'est une condition génétique résultant de mutations dans le gène VMA21 (Ramachandran et coll., 2013). Ce gène est crucial pour l'assemblage de la pompe V-ATPase, mais la mutation associée au XMEA cause une diminution dans l'activité de la pompe et une augmentation du pH lysosomal (Ramachandran et coll., 2013).

Qi et coll. (2007) ont démontré qu'il existe 4 isoformes de la sous-unité a chez la pompe V-ATPase des mammifères. Ces isoformes permettent une différenciation de la localisation chez les différents compartiments acides. L'isoforme a1 est située dans les vésicules synaptiques, l'isoforme a2 est située dans les endosmoses et le transGolgi, l'isoforme a3 est située dans les lysosomes, la membrane plasmique des ostéoclastes, etc., et l'isoforme a4 est située dans la membrane plasmique des tubules rénaux.

1.2.3 Les inhibiteurs

L'utilisation d'inhibiteurs de la pompe V-ATPase est essentielle dans d'étude de son rôle dans la cytopathologie causée par la séquestration des amines dans les compartiments acides des cellules. Parmi les nombreux inhibiteurs existants pour cette pompe, seule la bafilomycine A1, un extrait de *Streptomyces*, sera abordée lors de ce mémoire. Cet inhibiteur est très spécifique et très puissant pour la pompe V-ATPase, mais non spécifique des isoformes (Dröse et Altendorf, 1997 ; Forgac et coll., 2007). L'inhibition se fait grâce à la liaison de la bafilomycine A1 à la sous-unité c de la pompe (Fernandes et coll., 2006). L'utilisation *in vitro* des inhibiteurs de la pompe V-ATPase est très utile en laboratoire ; par contre leur utilisation *in vivo* est problématique. À cet effet, il fut démontré par Dow et coll. (1997) ainsi par Inoue

et coll. (1999) qu'une inhibition à long terme ou une délétion des gènes des sousunités essentielles de la pompe V-ATPase sont incompatibles avec la survie des espèces *Drosophila melanogaster* et *Mus musculus*.

Dans plusieurs études récentes, la bafilomycine A1 est exploitée afin de caractériser la vacuolisation secondaire à la capture et de la rétention des médicaments cationiques (Marceau et coll., 2009 ; Morissette, Lodge et Marceau, 2008a, 2009 ; Parks et coll., 2015). Un traitement avec l'inhibiteur de la pompe V-ATPase, bafilomycine A1, montre une diminution significative de la capture et la rétention des médicaments cationiques. Cette diminution démontre la relation étroite qui existe entre la capture et la rétention des médicaments cationiques dans les régions acides des cellules et l'action de la pompe. Malgré la pauvre tolérabilité *in vivo* de l'utilisation de la bafilomycine A1 (Niikura, Takeshita et Takano, 2005), il fut déjà démontré *ex vivo* qu'elle inhibe toujours la capture et la rétention d'un médicament cationique modèle, la quinacrine, dans les macrophages broncho-alvéolaires murins et sur des fragments de poumons de souris (Parks et coll., 2015).

Le monensin est un ionophore qui forme des complexes avec des cations monovalents, comme exemples : Li⁺, Na⁺, K⁺, Rb⁺, Ag⁺ et Ti⁺ (Huczyński A., et coll., 2007). Ce produit pharmacologique est capable de transporter ces cations à travers les membranes cellulaires. Ce mécanisme lui permet de jouer un rôle dans l'échange des cations Na⁺/H⁺. Il fut démontré que les traitements avec le monensin interfèrent avec le pH cellulaire (Gustavsson M. et coll., 2008). Nous utiliserons ici le monensin comme ionophore à protons.

1.3 Vacuolisation in vivo et connaissances actuelles

La vacuolisation cellulaire à la suite de traitements par des médicaments cationiques lysosomotropiques est bien documentée tant *in vitro* qu'*in vivo*. Une grande variété de médicaments cationiques utilisés en clinique est capable d'induire des changements morphologiques cellulaires qui découlent de la capture et de la rétention des amines dans les régions acides de la cellule. Quelques anesthésiques locaux et des amines administrées chroniquement sont des exemples de médicaments cationiques causant la cytopathologie vacuolaire à la concentration cliniquement pertinente.

Actuellement, il y a plusieurs études qui documentent très bien le processus de vacuolisation à la suite de l'accumulation des amines dans les régions acides des cellules *in vitro* et *in vivo*. Certaines études ont démontré une inhibition de la prolifération cellulaire sans toxicité importante. Malgré la documentation abondante sur cette cytopathologie, il existe encore certains aspects qui ne sont pas bien expliqués dans la littérature.

1.3.1 Démonstration in vivo

Dans de nombreuses études, les concentrations utilisées des médicaments cationiques qui s'accumulent dans les compartiments acides sont beaucoup plus élevées que celles atteintes en clinique (Marceau et coll., 2012 ; Parks et coll., 2015). Cependant, il y a des concentrations de médicaments cationiques (lidocaïne par exemple) utilisées dans certaines études qui reflètent les concentrations utilisées en clinique (Bawolak et coll., 2010).

Une application de lidocaïne 1%, une anesthésie locale, dans la chambre antérieure de l'œil cause une vacuolisation importante et une rétention significative du médicament cationique (Anderson et coll., 1999 ; Atilla et coll., 2003). La durée d'utilisation de l'anesthésie locale est relativement courte et la cytopathologie cellulaire de la vacuolisation est souvent résolue avec l'arrêt de l'administration. Par contre, certains agents cosmétiques, comme le diméthyléthanolamine (DMAE) et le triéthylanolamine, contiennent de hautes concentrations d'amines tertiaires (Morissette et coll., 2007). Ces concentrations causaient une vacuolisation excessive chez les fibroblastes dermiques de lapins. Une vacuolisation excessive pourrait exercer des effets sur la fonction normale des cellules touchées (effet

antiprolifératif, effet cytotoxique, etc.) comme dans le cas d'une crème anesthésique (EMLA).

Il existe aussi des médicaments cationiques administrés chroniquement chez les patients. Un exemple de médicament cationique est l'amiodarone. Ce dernier est un des meilleurs médicaments antiarythmiques et est fréquemment utilisé en clinique (Vassallo et Trohman, 2007). Il fut confirmé que l'accumulation vacuolaire de ce médicament dans les cellules était médiée par la pompe V-ATPase. Son accumulation serait une réponse à sa capture et sa rétention dans les régions acides (Morissette et coll., 2009). Cette étude suggérait l'hypothèse d'une certaine spécificité cellulaire pour la capture de l'amiodarone ; les macrophages démontraient une affinité plus élevée comparativement aux autres types de cellules en culture.

La chloroquine est un second exemple de médicament cationique administré systématiquement chez des patients. On sait que ce médicament cause une phospholipidose (Zheng et coll., 2011). Étant un médicament cationique lysosomotropique, la cytopathologie causée par l'administration de la chloroquine pourrait être expliquée par sa séquestration dans les compartiments acides.

<u>1.3.2 Synthèse actuelle de la cytopathologie causée par la séquestration des</u> <u>cations</u>

La cytopathologie causée par la séquestration de cations dans les compartiments acides est documentée dans différents types cellulaires (De Duve et coll., 1974 ; Marceau et coll., 2012 ; Roy et coll., 2013).

La séquestration des médicaments cationiques est médiée indirectement par la pompe V-ATPase des régions acides des cellules. Parmi les réponses à la suite de cette accumulation des cations, il y a une accumulation autophagique (inhibition du flux) et la présence d'une phospholipidose. Ces réponses tardives sont à la suite de

l'incompétence lysosomale. Nos traveaux ont permis de généraliser ces mécanismes (Morissette et coll., 2008, 2009 ; Roy et coll., 2013). La phospholipidose sera expliquée plus en détail dans la section 4 de l'introduction. En plus de causer une inhibition du flux autophagique et une phospholipidose, la séquestration des cations augmente la lysosomogénèse des cellules. Une rétroaction tardive qui serait liée à l'incompétence lysosomale à la suite du tamponnage du pH (Parks et coll., 2015).

Une inhibition de la migration cellulaire fut observée par Morissette et coll. (2004) à la suite de traitements avec la procainamide chez les cellules du muscle lisse de lapin. Des traitements avec des médicaments cationiques lysosomotropiques produisent aussi un arrêt mitotique. Cette inhibition est aussi produite avec l'administration de médicaments cationiques ; la lidocaïne chez les cellules du muscle lisse humain (Bawolak et coll., 2010), le 2-diméthylaminoéthanol chez les cellules fibroblastes dermiques de lapin (Morissette et coll., 2007b), la triéthylamine (Et₃N) et la procainamide chez les cellules (Morissette et coll., 2004 ; 2005). Le mécanisme de cet arrêt fut étudié et généralisé par notre laboratoire en utilisant une série de s-Et₃N (triéthylamines substituées) dans différentes lignées cellulaires (Parks et coll., 2016).

Les concentrations des médicaments cationiques lysosomotropiques qui induisent une séquestration des cations ne sont souvent pas celles utilisées en clinique. Seulement la concentration thérapeutique de quelques anesthésiques locaux serait capable de causer la cytopathologie à la suite de la séquestration des cations.

Malgré la documentation abondante relative à la cytopathologie causée par la séquestration des médicaments cationiques dans les régions acides des cellules, il existe quelques aspects encore inconnus. Une accumulation autophagique est observée lors de cette cytopathologie, mais son origine est inconnue. Cette dernière peut provenir d'un dommage aux organelles de la cellule ou de l'inhibition du flux

autophagique à la suite d'une accumulation d'autophagolysosomes non fonctionnels. Il fut démontré que cette accumulation autophagique n'est pas reliée à une déprivation nutritionnelle cellulaire par l'étude du niveau de phospho-AKT (Bawolak et coll., 2010). Il est connu que l'accumulation des médicaments cationiques dans les régions acides (lysosomes) de la cellule provoque un tamponnage de leur pH. Ce dernier pourrait déclencher une réponse d'une lysosomogénèse de la cellule (Funakoshi et coll., 2013). Deux études antérieures démontrent une augmentation des protéines lysosomales, LAMP1 et LAMP2, chez des cellules traitées avec des médicaments cationiques, dont l'imatinib et la chloroquine (Ertmer et coll., 2007; Chen et coll., 2011). Si les cellules augmentent leur processus de lysosomogénèse à la suite de l'accumulation des amines dans leurs compartiments acides, il serait possible d'observer une translocation nucléaire du facteur de transcription EB (TFEB) activé (Sardiello et coll., 2009). Son activation fut déjà raportée chez des cellules traitées avec le médicament cationique chloroquine (Roczniak-Fergusson et coll., 2012) et le propranolol (Logan et coll., 2014). Finalement, une certaine spécificité tissulaire et cellulaire de la capture et la rétention des amines ont été documentées chez certaines études. Morissette et coll. (2009) ont démontré que les macrophages accumulaient significativement plus d'amiodarone que les cellules des muscles lisses. Roy et coll. (2013) démontraient que les neutrophiles avaient une plus haute affinité, mais un V_{max} plus faible, pour la quinacrine comparativement aux lymphocytes. De plus, Baik et coll. (2013) avaient observé une redistribution in vivo du médicament cationique clofazimine des tissus adipeux aux organes riches en macrophages, comme le foie et la rate, en fonction du temps. Cette accumulation dans certains organes et certains types cellulaires sont la fondation de l'hypothèse de transporteurs membranaires pour les amines tertiaires.

L'effet antiprolifératif de la vacuolisation cellulaire à la suite de l'accumulation des amines dans les régions acides de la cellule est documenté, mais pas encore bien compris. Une nouvelle étude propose une hypothèse explicative. Kuzu et coll. (2014) documentent un renversement partiel de l'effet antiprolifératif du médicament

cationique leelamine suite à un traitement avec la β -cyclodextrine afin d'extraire le cholestérol cellulaire. Il est possible que cet antagonisme soit relié à l'augmentation de l'expression des gènes qui régulent la synthèse des lipides cellulaires, comme le cholestérol. Une explication possible pour cette augmentation serait la phospholipidose, une cytopathologie causée par une réorganisation des vacuoles dilatées avec des médicaments cationiques (Sawada et coll., 2005 ; Nioi et coll., 2007).

2. Médicaments cationiques lysosomotropiques

L'accumulation des médicaments cationiques dans les compartiments acides de la cellule est bien documentée. Ces médicaments sont basiques, avec un pKa d'environ 8-10, se concentrent dans les régions acides à cause de leur faible rétrodiffusion (sous forme protonée) et augmentent le volume de ces compartiments osmotiquement. De Duve et coll. (1974) ont démontré que le rapport des concentrations des médicaments cationiques était égal au ratio des concentrations des protons d'hydrogène dans les compartiments acides des cellules. Les médicaments qui peuvent causer la vacuolisation cellulaire sont dits lysosomotropiques. Afin d'effectuer nos études lors de ce mémoire, une série de 6 triéthylamines substituées (s-Et₃N) a été utilisée. Ces médicaments sont reconnus comme étant capables de s'accumuler dans les régions acides des cellules d'une manière V-ATPase dépendante.

2.1 Procainamide

La procainamide est un médicament antiarythmique quelque peu délaissé maintenant. Afin d'avoir une efficacité optimale, ce médicament cationique doit être administré chroniquement. Il fut approuvé par l'Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA) lors des années 1950 sous le nom Pronestyl. Le besoin de trouver un médicament alternatif à celui utilisé lors de la Première Guerre mondiale, la procaïne, était une motivation importante pour la découverte de la procainamide. L'équipe de Mark et coll. (1951) a découvert que la procainamide était une molécule avec des propriétés antiarythmiques semblables à celles de la procaïne.



FIGURE 2 : Structure de la procainamide

On connait depuis longtemps la formation significative de vacuoles cytoplasmiques chez des cellules traitées avec certains médicaments cationiques, dont la procaïne, la procainamide, la nicotine, l'atropine, etc. (Belkin et coll., 1962 ; Finnin et coll., 1969 ; Henics et Wheatley, 1997 ; Ohkuma et Poole, 1981). La procainamide est aussi active chez des cellules du muscle lisse pulmonaire de lapin à des concentrations non-thérapeutiques (Morissette et coll., 2004 ; 2008a). Ce médicament fut choisi, parmi 5 autres, pour réaliser nos différentes études décrites dans le présent mémoire.

2.2 Lidocaïne

La lidocaïne est un médicament cationique synthétisé pour la première fois en 1943 par le chimiste Nils Löfgren sous le nom de xylocaine (Löfgren et Lundqvist, 1946). On dit que ce médicament est la forme d'anesthésie locale la plus utilisée en clinique. Il agit aussi comme un médicament antiarythmique ventriculaire parmi les membres de la famille des aminoamides. La lidocaïne agit comme un inhibiteur des canaux sodiques qui diminue les contractions ventriculaires et diminue les signaux neuronaux envoyés au cerveau.



FIGURE 3 : Structure de la lidocaïne

L'efficacité de l'action anesthésique de la lidocaïne est caractérisée par une action rapide et une durée d'action moyenne à la suite de son administration. L'action rapide de ce médicament est avantageuse comparativement à d'autres médicaments anesthésiques, comme la bupivacaïne. La lidocaïne est associée

avec la prilocaïne dans la crème EMLA (Cepeda et coll., 2010). En plus de son action anesthésique, la lidocaïne est classée comme étant l'agent antiarythmique de classe lb le plus important en clinique. Lorsque l'amiodarone (un autre médicament cationique qui sera abordé un peu plus loin) n'est pas disponible comme traitement, la lidocaïne est utilisée afin de traiter une panoplie de pathologies arythmiques ; des arythmies ventriculaires, des infarctus du myocarde, un empoisonnement aux dioxines ou un cathétérisme cardiaque (Marti-Carvajal et coll., 2015).

Morissette et coll. (2011) et Bawolak et coll. (2010), ont démontré que les anesthésiques locaux, dont la bupivacaïne, la lidocaïne et la procaïne, induisaient la cytopathologie vacuolaire. Bawolak et coll. (2011) ont démontré qu'un traitement avec la lidocaïne ou la procaïne induisait une vacuolisation massive dans les cellules du muscle lisse et que cette pathologie était inhibée par un cotraitement de l'inhibiteur de la pompe V-ATPase ; la bafilomycine A1. En plus de provoquer une vacuolisation, le traitement avec ces médicaments cationiques induisait une augmentation dans la signalisation autophagique, une fusion des lysosomes avec les phagosomes pour former les autophagolysosomes et aussi un effet antiprolifératif chez les cellules.

2.3 Hydroxychloroquine

L'hydroxychloroquine (HCQ) est un médicament administré pour le traitement de la malaria, de l'arthrite rhumatoïde, des pathologies inflammatoires et certains cancers. À l'exception de la présence d'un groupement hydroxyle, cette molécule est structuralement similaire à celle du médicament chloroquine. Les propriétés pharmacocinétiques de l'hydroxychloroquine sont très similaires à celles du médicament chloroquine (abordé ci-dessous) (Kalia et coll., 2007).



FIGURE 4 : Structure de l'hydroxychloroquine

Ce médicament, principalement utilisé dans un plan de traitement contre la malaria, commence à être utilisé pour traiter de nombreuses pathologies, dont lupus érythémateux (Petri et coll., 1994 ; Tsakonas et coll., 1998), les pathologies rhumatismales (Van Der Heijde et coll., 1989 ; O'Dell et coll., 1996), le syndrome de Gougerot-Sjögren (Ponge et coll., 1986), la porphyrie (Malkinson et coll., 1980 ; Petersen et coll., 1992) et même certains cancers (Poklepovic et coll., 2014 ; Livesey et coll., 2009 ; Rahim et coll., 2009).

L'HCQ, étant une base faible lipophile, est capable d'entrer avec facilité dans la cellule en passant à travers les membranes cellulaires par diffusion simple. Une fois dans la cellule, ce médicament est capté et retenu dans les compartiments acides de la cellule où il est protoné (Kaufmann et coll., 2007). Une accumulation de ce médicament cationique dans les compartiments acides de la cellule modifie leur pH. Une augmentation du pH dans les lysosomes à la suite de la capture et de la rétention de l'hydroxychloroquine cause une diminution dans l'activité intracellulaire, diminue la glycosylation et modifie la sécrétion des protéines. Ces modifications emportent des conséquences importantes pour la cellule (Oda et coll., 1986). Une étude par Takeda et coll. (2003) démontre une inhibition des récepteurs de type Toll 9 (TLR 9) des cellules traitées par l'hydroxychloroquine. Ces récepteurs médient la réponse inflammatoire à la suite d'une stimulation microbienne (Takeda et coll., 2003).

2.4 Chloroquine

La chloroquine (CQ) est un autre exemple d'un médicament avec des propriétés lysosomotropiques. Ce médicament cationique fut découvert en 1934 par l'équipe de Hans Andersag chez Bayer (Krafts et coll., 2012). Lors de la Deuxième Guerre mondiale, les États-Unis d'Amérique ont entrepris des essais cliniques gouvernementaux avec la chloroquine afin de traiter les soldats de la malaria ; les avantages de son utilisation en clinique ont été mis en évidence (<u>http://www.cdc.gov/malaria/about/history/</u> Obtenue le 8 juillet, 2016).



FIGURE 5 : Structure de la chloroquine

Tout comme l'hydroxychloroquine, la chloroquine est utilisée pour le traitement de la malaria (Slater et Cerami, 1992) en plus de l'arthrite rhumatoïde (Lard et coll., 2001), l'amibiase (Cohen et Reynolds, 1975), le lupus érythémateux (Mastaglia et coll., 1977 ; Meinao et coll., 1996) et certains cancers (Solomon et Lee, 2009 ; Kimura et coll., 2013 ; Fan et coll., 2006).

Les propriétés lysosomotropiques de la chloroquine expliquent partiellement son efficacité pour traiter la malaria. Son accumulation dans les compartiments acides du parasite interfère avec ses processus digestifs. Ses propriétés permettent son utilisation dans les pathologies reliées aux lipides, aux pathologies reliées à l'autophagie et à l'apoptose (Chen et coll., 2011 ; Kurup et coll., 2010 ; Kim et coll.,

2010). Kim et coll. (2010) ont démontré que le traitement de la lignée cellulaire de glioblastome (U87MG) avec la chloroquine active le réseau de signalisation p53 et inhibe leur prolifération. La chloroquine bloque le processus autophagique à la suite de l'inhibition des protéases lysosomales et de l'inhibition de la fusion des autophagosomes et des lysosomes et ces inhibitions semblent participer à l'effet anticancer de ce médicament cationique (Svarino et coll., 2006 ; Amaravadi et coll., 2011).

2.5 Quinacrine

La quinacrine (QX), connue sous le nom d'Atabrine, ou de Mépacrine, fut développée en Allemagne dans les années 1920. Son premier essai clinique contre la malaria fut en 1930 (Schadewaldt, 1975). Lors de son utilisation pendant la Deuxième Guerre mondiale, environ 3 millions soldats américains utilisèrent ce médicament. Vers la fin de la guerre, l'essai clinique de la quinacrine démontra que son efficacité contre la malaria était significativement inférieure au médicament cationique chloroquine (Goodman et Gilman, 1954).



FIGURE 6 : Structure de la quinacrine

La quinacrine est rapidement absorbée par l'organisme. Malgré la concentration plasmatique faible lors de son administration, sa concentration tissulaire est relativement élevée. Les organes qui démontrent une concentration plus élevée

dans l'organisme sont le foie, la rate, les poumons et les glandes surrénales (Huang et coll., 2006 ; Ehsanian et coll., 2011 ; Wallace, 1989).

Il y a plusieurs mécanismes d'actions que la quinacrine peut exercer lors de son administration dans l'organisme. Un exemple de mécanisme serait qu'il peut se lier à l'acide désoxyribonucléique (ADN) par une intercalation entre les paires de bases. Cette liaison inhibe sa dénaturation, sa dépolymérisation enzymatique, et sa transcription en acide ribonucléique (ARN) (Voiculetz et coll., 1974 ; O'Brien et coll., 1966 ; Doglia et coll., 1986).

La quinacrine s'accumule dans les leucocytes (Erman, Azuri et Raz, 1984). Roy et coll. (2013) ont démontré que les leucocytes polymorphonucléaires (PMNLs) avaient une affinité plus élevée pour la quinacrine que celle des lymphocytes, mais avaient une capture inférieure. Cette étude comprend un mécanisme de transport cellulaire spécifique qui permet d'expliquer la distribution sélective parmi les leucocytes.

Il fut démontré que la quinacrine bloque la rupture des brins d'ADN induite par la radiation, mais augmente son effet antiprolifératif (Voiculetz et coll., 1974 ; Biller et coll., 1982 ; Giampeitri et coll., 1980 ; Fuks et Smith., 1971 ; Hiller, 1970 ; Pfab, Schachtschabel et Kern, 1985). La quinacrine réduit l'incidence de cancer chez les souris traitées avec la nitrosourée (McCormick, 1988), diminue le nombre de mutations somatiques chez les cellules de leucémies murines (Giampeitri et coll., 1980 ; Bach, 1969) et renverse la résistance à la vincristine (Inaba et Maruyama, 1988).

La quinacrine fut déjà utilisée afin d'étudier en profondeur la nature de la capture et de la rétention des médicaments cationiques. Les cellules traitées avec des concentrations micromolaires de quinacrine montraient une accumulation autophagique (Marceau, Roy et Bouthillier, 2013). Marceau et coll. (2009) démontrèrent que les vacuoles induites par l'accumulation de quinacrine avaient un

18

profile d'autophagolysosome et que la quinacrine avait une affinité d'environ 500 fois plus élevée comparativement à la procainamide.

2.6 Amiodarone

En 1961, les chimistes belges Tondeur et Binon ont développé l'amiodarone à partir d'analogue du « *khellin* » (une herbe anciennement utilisée pour ses propriétés médicinales). Peu après son développement, ce médicament fut utilisé en Europe pour traiter l'angine de poitrine (Deltour et coll., 1962 ; Charlier, Tondeur et Binon, 1962). Les propriétés antiarythmiques de l'amiodarone furent démontrées par Bramah Singh et cette molécule fut classifiée dans la classe III (Singh et Vaughan Williams, 1970). Par la suite, son utilisation pour traiter les patients qui souffrent d'arythmies ventriculaires et supraventriculaires fut introduite en Argentine par le physicien Mauricio Rosenbaum (Rosenbaum et coll., 1976). Depuis les années 1980, l'amiodarone est utilisée de façon routinière et prescrite mondialement pour traiter les arythmies cardiaques.



FIGURE 7 : Structure de l'amiodarone

Classifié dans la classe III des agents antiarythmiques, l'amiodarone augmente la durée de la phase 3 du potentiel d'action cardiaque, de la phase de la répolarization et augmente la perméabilité du potassium. Il fut démontré que ce médicament cationique avait des propriétés anti-arythmiques comparables à celles des bêtabloquants et des inhibiteurs calciques sur les nœuds atrioventriculaires et sinusaux (Kodama, Kamiya et Toyama, 1999).

Malgré ses effets bénéfiques pour traiter les arythmies cardiaques, l'amiodarone provoque plusieurs effets secondaires non désirables. Une administration chronique de ce médicament démontre des changements de coloration de la peau (une pigmentation bleue grise) (Wiper, Roberts et Schmitt, 2007), des pathologies neurologiques périphériques (Fraser et coll., 1985), des dépôts au niveau de la cornée (Chew, Ghosh et McCulloch, 1982), des actions antithyroïdiennes (Newman et coll., 1998) et des effets pulmonaires dangereux (Panagiotou et coll., 2011). Une explication possible pour sa toxicité pulmonaire fut abordée par Antonini et Reasor (1991). Ils démontrent que l'amiodarone s'accumule significativement dans les macrophages alvéolaires des rats.

Morissette et coll. (2009) ont démontré que l'accumulation et la rétention de l'amiodarone dans les cellules humaines (macrophages, muscles lisses et HEK 293a) étaient motivées par l'action de la pompe V-ATPase. L'utilisation de l'inhibiteur de cette pompe, la bafilomycine A1, inhibait la vacuolisation induite par l'accumulation de ce médicament. En plus d'une accumulation autophagique, ils ont aussi observé la présence d'une phospholipidose chez les cellules traitées avec ce médicament. Une perturbation dans le métabolisme lipidique des cellules traitées avec l'amiodarone fut aussi observée (Honegger et coll., 1993).
3. Autophagie

3.1 Historique

Le terme autophagie provient des mots grecs *auto* et *phagein* qui signifient, respectivement, soi-même et manger. L'autophagie est un processus cellulaire qui permet l'élimination ou la dégradation des compartiments de la cellule par des lysosomes (Kobayashi, 2015). Il existe trois sortes d'autophagie possibles chez les cellules ; la macroautophagie, la microautophagie et l'autophagie médiée par des protéines chaperonnes. Lors de ce mémoire, le terme « autophagie » sera utilisé en référence à la macroautophagie. Les constituants cytoplasmiques sont isolés et enveloppés dans des compartiments sous le nom d'autophagosome. Une fois fusionnés avec les lysosomes, les autophagosomes sont connus sous le nom d'autophagolysosomes et les constituants sont dégradés et recyclés (Patel et coll., 2012).

En 1963, une étude apporta une description structurale de la dégradation cytoplasmique focale. Cette étude, par Hruban et coll. (1963), avait permis à reconnaître les trois étapes continues de la maturation du cytoplasme. Ils avaient aussi démontré que le processus ne se limite pas aux états endommagés, mais fonctionne aussi sous des conditions physiologiques pour la réutilisation des matériaux cellulaires et de la disposition des organelles.



FIGURE 8 : Schéma simplifié du processus autophagique. (Melendez et Levine., 2005)

Christian de Duve baptisa ce phénomène cellulaire "Autophagy". Il utilisa ce terme d'une part de la fonction lysosomale lors de sa description du rôle du glucagon dans la dégradation cellulaire présente dans le foie. Il démontra que les lysosomes étaient responsables de l'autophagie induite par le glucagon (Deter et coll., 1976 ; Deter et De Duve, 1967). Cette étude fut la première à faire le lien entre les lysosomes de la cellule et le processus autophagique (Klionsky, 2008).

3.2 Biologie moléculaire

Les gènes et les protéines responsables pour l'autophagie sont connus sous l'abréviation Atg (autophagy-related). Les premiers gènes reliés à l'autophagie furent identifiés chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Funakoshi et coll., 1997 ; Matsuura et coll., 1997 ; Tsukada et Ohsumi, 1993). Le processus autophagique peut être décortiqué en 5 parties principales ; l'induction de l'autophagie, la sélection des cargaisons, la formation des vésicules, la fusion des autophagosomes avec les vacuoles et l'élimination et la dégradation du contenu des vacuoles.

L'activation du processus autophagique commence par la déphosphorylation et l'activation des kinases ULK. Ces kinases font partie d'un complexe protéique qui contient Atg13, Atg101 et FIP200 (Jung et coll., 2009). De plus, les ULKs phosphorylent et activent Beclin-1. Ce dernier est la protéine humaine homologue au gène Atg6 de la levure (Russel et coll., 2013). Le complexe protéique de la Beclin-1 comprend les protéines p150, Atg14L et la kinase phosphatidilinositol 3-phosphate VPS34 (Kang et coll., 2011). Une fois activés, les complexes de Beclin-1 et des ULKs se localisent au site d'initiation des autophagosomes : le phagophore. Une fois au site, ces complexes permettent l'activation des réseaux de signalisation essentiels au processus autophagique (Bartolomeo et coll., 2010 ; Hara et coll., 2008).

Il y a deux kinases essentielles à la régulation de l'autophagie ; « *mammalian target* of rapamycin » (mTOR) et 5' « *adenosine monophosphate-activated protein*

kinase » (AMPK) (Russsel, Yuan et Guan, 2014). Leur activité est régulée par une panoplie de signaux intracellulaires, dont la présence de facteurs de croissance ou des dérivés réactifs de l'oxygène en sont quelques exemples. Ces deux kinases permettent la régulation du processus autophagique par leur effet phosphorylation inhibitrice de la kinase Unc-51-like ULK1 et ULK2 (homologue mammalien de Atg1) (Chan, 2012).

La première des deux conjugaisons « *ubiquitin-like* » du processus autophagique provoque une liaison covalente des protéines Atg12 et Atg15. Ce conjugué protéique lie par la suite Atg16L1 pour former un complexe « *E3-like* ». Ce dernier agit comme la deuxième conjugaison « *ubiqutin-like* » (Hanada et coll., 2007). La protéine Atg16L1 est essentielle pour la formation des autophagosomes à la suite de son recrutement au phagophore de « *WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 2* » (WIPI2) (Dooley et coll., 2014). Ce complexe protéique de Atg16L1 permet la liaison et l'activation de Atg3 qui à son tour forme des liaisons covalentes entre les protéines mammaliennes homologues de Atg8 (dont le LC3A-C, le GATE16 et le GABARAPL1-3) et les lipides à la surface des autophagosomes (Kabeya et coll., 2004).

Les protéines homologues au Atg8 les plus étudiées sont les « *microtubule-associated protein light chain* » (LC3). La forme lipidée de LC3 contribue à la fermeture des autophagosomes (Fujita et coll., 2008) et permet la liaison de protéines adaptatrices spécifiques, comme le p62/SQSTM1 (Park et coll., 2014). Une fois l'autophagosome formé, ce dernier fusionne avec un lysosome avec l'aide des SNAREs (Fader et coll., 2009 ; Furuta et coll., 2010) et des « *UV radiation resistance-associated gene protein* » (UVRAG) (Kim et coll., 2015 ; Liang et coll., 2008) pour former un autophagolysosome est dégradée avec le contenu pendant que la protéine LC3 qui se retrouve sur la surface externe se fait cliver par Atg4 et ensuite se fait recycler (Satoo et coll., 2009). Le contenu des autophagolysosomes est

dégradé et les acides aminés sont relâchés grâce à l'action des perméases (Yang et coll., 2006).

Les protéines LC3-II et p62/SQSTM1 sont deux indicateurs autophagiques couramment utilisés dans l'étude du processus autophagique. Une augmentation de la quantité de LC3-II (sous sa forme clivée et lipidée) présente permet d'étudier s'il y a la présence d'une inhibition ou d'une induction du flux autophagique, comparativement à la protéine p62/SQSTM1 qui est dégradée seulement par la macroautophagie. Une augmentation de cette dernière démontre une inhibition du flux autophagique. Une étude complète du processus autophagique comprend l'analyse de ces deux protéines autophagiques.

3.3 Fonctions

L'autophagie a de nombreuses fonctions cellulaires. Un exemple classique est l'induction du processus autophagique dans la levure à la suite d'un manque d'éléments nutritifs. Dans ces conditions défavorables, les protéines sont dégradées et les acides aminés qui les formaient sont recyclés pour la synthèse de protéines essentielles à la survie de la cellule (Reggiori et Klionsky, 2002 ; Klionsky et Emr, 2000 ; Levine et Klionsky, 2004). Le gène connu sous le nom de Atg7 joue un rôle essentiel dans l'autophagie induite par l'absence d'éléments nutritifs dans la cellule (Mizushima et coll., 2004)

En plus de l'absence d'éléments nutritifs, il existe une motivation immunitaire pour le processus autophagique. La xénophagie est la dégradation de particules pathogéniques par l'autophagie. Certains agents pathogènes, comme le *Mycobacterium tuberculosis,* sont des cibles de dégradation par le même mécanisme qui cible la dégradation d'organelles endommagées (Deretic et coll., 2009). L'autophagie permet la réparation cellulaire, où elle va dégrader des organelles, des protéines ou des membranes plasmiques endommagées. Une

absence d'autophagie est une explication possible du vieillissement cellulaire et des dommages cellulaires (Cuervo et coll., 2005).

3.4 Autophagie et le cancer

L'autophagie joue un rôle crucial dans la physiopathologie du cancer ; elle peut jouer un rôle protecteur contre le cancer ou jouer un rôle dans la croissance des cellules cancéreuses (Tavassoly, 2015 ; Furuya, Liang et Levin, 2004).

Le processus autophagique joue un rôle important dans la tumorigenèse. Certaines études ont démontré que le niveau d'autophagie chez des cellules cancéreuses étaient moindres que dans les cellules saines (Gunn et coll., 1977 ; Kisen et coll., 1993 ; Kirkegaard, Taylor et Jackson, 2004). Chez des lignées cellulaires cancéreuses du sein, on a souvent observé une altération ou une délétion de l'allèle Beclin-1 (BECN1); le gène humain homologue au Atg6/Vps30. Les niveaux d'expression de BECN1 chez 18 de 32 lignées de cancer du sein étaient significativement inférieurs au niveau des cellules épithéliales normales (Liang et coll., 1999). Deux études, dont Qu et coll. (2003) et Yue et coll. (2003), ont démontré qu'une délétion de l'allèle BECN1 promouvait une carcinogenèse chez les souris. Ces dernières démontraient une incidence élevée de cancer de poumon, de carcinome hépatique et de lymphome. Une explication possible proposée par Cuervo (2004) est que les cellules cancéreuses juvéniles en développement ont des niveaux plus élevés de leur synthèse protéique que ceux de leur dégradation protéique. De plus, on a proposé que l'autophagie permettrait de diminuer le taux de mutations possibles par l'élimination des organelles endommagées qui produisent des radicaux libres (Edinger et Thompson, 2003).

Malgré son effet de promotion d'une tumorigenèse lors de son inhibition, le niveau basal d'autophagie semble être significativement plus élevé lors des stages avancés de cancer. Il semble que ce processus agirait comme un mécanisme de protection contre les stress cellulaires (Ogier et Codogno, 2003 ; Gozuacik et Kimchi, 2004 ;

Cuervo, 2004). Cuervo (2004) explique que les cancers à des stades avancés sont normalement moins vascularisés et donc ont besoin du processus autophagique afin de survivre dans cet environnement privé de nutriments et d'oxygène. La carence de nutriments essentiels est capable de promouvoir l'autophagie chez une variété de lignées cancéreuses, dont le cancer du côlon, le cancer du sein, un mélanome, un hématome et un gliome malin (Ogier-Denis et coll., 1996 ; Liang, Brown et Levine, 2001 ; Proikas-Cezanne et coll., 2004 ; Susan et Dunn, 2001 ; Ito et coll., 2005).

L'autophagie est clairement capable de promouvoir la croissance de cellules cancéreuses sous certaines conditions, mais ce processus peut aussi causer la mort des cellules. Clarke (1990) démontra que le processus autophagique peut induire la mort cellulaire indépendamment de l'apoptose. Une étude par Bursch et coll. (1996) démontra que les cellules de cancer du sein traitées par le tamoxifène subissaient une mort cellulaire autophagique. La rapamycin, un inhibiteur de mTOR, réduit la prolifération et induit l'autophagie chez les cellules d'un gliome malin (Takeuchi et coll., 2005). Par contre, comme mentionné ci-haut, il faut faire attention lorsqu'on induit l'autophagie, car celle-ci peut être protectrice des cellules cancéreuses (Ogier-Denis et Codogno, 2003).

Les médicaments cationiques lysosomotropiques tels l'hydroxychloroquine et la chloroquine sont présentement en essais cliniques oncologiques chez des humains. Amaravadi et coll. (2007) ont démontré une induction de la mort cellulaire par l'inhibition de l'autophagie par l'hydroxychloroquine chez un lymphome murin. La chloroquine démontre des propriétés spontanées à diminuer la lymphomogénèse chez des modèles murins de lymphome (Maclean et coll., 2008). Ces études visent à démontrer que l'inhibition du flux autophagique par l'hydroxychloroquine et par la chloroquine pourraient augmenter l'efficacité des agents chimiothérapeutiques.

3.5 Autophagie et cholestérol

Le processus autophagique et la présence de cholestérol cellulaire sont étroitement reliés. Une étude récente a démontré, par l'accumulation protéique de LC3-II à la suite d'une ablation du cholestérol intracellulaire par traitement de méthyle-β-cyclodextrine, qu'il y avait une induction du processus autophagique (Cheng et coll., 2006).

Dans la pathologie de Niemann-Pick de type C (NPC), il y a une accumulation de sphingomyéline dans les lysosomes des cellules. Elle est généralement induite par une mutation dans le gène NPC1. Une mutation dans ce gène induit une perturbation dans le métabolisme des sphingolipides. Une étude intéressante avait démontré une relation entre les cellules avec une accumulation de sphingolipides de cette pathologie et une accumulation autophagique (augmentation protéique de LC3-II) (Ishibashi, Yamazaki et Okamoto, 2009). L'association entre l'autophagie et le cholestérol commence à être de plus en plus étudiée dans la littérature En effet, une étude par Xu et coll. (2010) avait démontré une scientifique. accumulation autophagique à la suite de traitement par une quantité excessive de cholestérol libre. L'induction du processus autophagique agirait comme un mécanisme de protection contre la mort cellulaire induite par la quantité excessive de cholestérol. Il fut démontré par Singh et coll. (2009) que le processus autophagique est essentiel au maintien et au contrôle du métabolisme des lipides.

Kuzu et coll. (2014) ont observé une accumulation du cholestérol avec une interruption dans le réseau vacuolaire à la suite de traitement par le médicament cationique lysosomotropique leelamine. Ce médicament démontrait des propriétés antiprolifératives, inhibait le flux autophagique, inhibait l'endocytose et démontrait aussi une altération de la localisation subcellulaire du cholestérol. Cette étude montrait aussi un renversement de la mort cellulaire induite par la leelamine et un rétablissement du système de trafic vacuolaire par un cotraitement par la β -cyclodextrine.

4. Phospholipidose

La phospholipidose induite par des médicaments est définie comme l'accumulation intracellulaire des phospholipides à l'intérieur des corps lamellaires avec la présence de structures lysosomales avec des couches de lipides non dégradées (Reasor et Kacew, 2001). Cette pathologie fut démontrée dans une panoplie de lignée cellulaire, dont les poumons, le foie, les reins, la cornée, etc. et plus de 50 différents médicaments induisent cette pathologie à la suite de traitement chronique. Tous ces médicaments sont essentiellement des amines qui provoquent la cytopathologie causée par la séquestration de cations médiée par la pompe V-ATPase (Reasor et coll., 2006).

Comme mentionné auparavant, l'amiodarone cause la phospholipidose chez les cellules (Morissette et coll., 2009), chez des leucocytes périphériques des patients (Somani et coll., 1986) et chez les macrophages alvéolaires animaux. La chloroquine, à une concentration de 50 μ M, induit une phospholipidose chez la lignée cellulaire épithéliale de « *Madin-Darby canine kidney* » (MDCK) où le médicament était concentré dans des corps multilamellaires et multivesiculaires. Encore une fois, tous ces changements pathologiques étaient abolis par un cotraitement avec l'inhibiteur de la pompe V-ATPase, la bafilomycine A1 (Zheng et coll., 2011).

Un mécanisme de formation de la phospholipidose induite par les médicaments cationiques fut proposé par Reasor et coll. (2006). Malgré sa réversibilité après l'arrêt de l'administration du médicament et malgré sa réputation généralement inoffensive, l'Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA) établit en 2004 un comité d'étude pour la phospholipidose. La motivation derrière cette initiative était principalement motivée par la grande ressemblance entre la phospholipidose et la pathologie de Niemann-Pick (Vallance et coll., 2004 ; Piccoli et coll., 2011) et l'incertitude concernant la signification des effets cellulaires et tissulaires (Nioi et coll., 2007).

Comme mentionné précédemment, la procainamide et l'amiodarone ont été utilisées *in vitro* pour modéliser la phospholipidose (Morissette et coll., 2008a ; 2009). Ces études proposent que l'accumulation répétitive du processus autophagique serait la source des corps multilamellaires (Morissette, Lodge et Marceau, 2008a).

5. Objectifs du projet de recherche

Les objectifs de ce projet de maitrise consistaient deux parties :

La première partie de ce projet consiste de l'exploitation du médicament cationique quinacrine afin d'étudier en profondeur la vacuolisation cellulaire dans un modèle murin. La distribution subcellulaire et tissulaire de ce médicament seront étudiées à l'aide de sa fluorescence naturelle. L'accumulation autophagique et la présence d'une lysosomogénèse seront analysées à la suite de traitement par la quinacrine. Finalement, ce médicament cationique sera administré *in vivo* dans un modèle murin afin de confirmer que la capture et la rétention du médicament par la pompe V-ATPase cause une accumulation autophagique et une lysosomogénèse.

La deuxième partie du projet consiste de l'étude approfondie de l'effet cytostatique et cytotoxique de médicaments cationiques lysosomotropiques chez 4 lignées cellulaires différentes. Nos hypothèses dans cette étude sont que l'effet antiprolifératif des amines est un mécanisme universel et relié à une altération du trafic vacuolaire et que le pouvoir cytostatique sera inversement corrélé à la lipophilicité du médicament cationique et à son inhibition du flux autophagique. Afin de répondre à ces dernières, une série de 6 médicaments de nature triéthylamines substituées (définie dans la section 2 de l'Introduction) sera utilisée sur 4 lignées cellulaires différentes avec un certain accent sur une lignée cellulaire de lymphome histiocytaire p53-négative.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Inhibition du flux autophagique et lysosomogénèse à la suite de la séquestration du médicament cationique la guinacrine dans un modèle murin

1.1 Matériel

1.1.1 Cellules et animaux

L'utilisation des souris mâles C57BL/6 (Charles River, St. Constant, QC, Canada) âgés de 8 semaines fut approuvée par le comité d'éthique local. Elles furent utilisées pour l'isolation de cellules et de tissus en plus de l'administration *in vivo* de quinacrine (Comité de protection des animaux CHU de Québec, numéros d'homologation 12-073 et 2015-029).

Les fibroblastes dermiques de souris (FDS) furent cultivés à partir d'explants provenant d'animaux euthanasiés à l'aide d'une combinaison d'isoflurane et dioxyde de carbone (CO₂). Ces cellules étaient maintenues dans Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Life Technologies) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (FBS), 1% de L-glutamine et 1% de pénicilline-streptomycine, jusqu'à un passage maximum de 6. La lignée de cellules de reins humains (HEK 293a) fut aussi utilisée et obtenue originalement de Sigma-Aldrich et fut maintenue dans le milieu de culture DMEM supplémenté avec 10% de FBS, 1% de L-glutamine et 1% de pénicilline-streptomycine. En plus des FDS et des HEK293a, des macrophages de souris furent obtenus à la suite de lavages bronchoalvéolaires sous forme d'une suspension dans du phosphate buffered saline (PBS) contenant 0,2% Éthylène Diamine Tétra-Acétique (EDTA) (Boilard et coll., 2014), centrifugés (1,500 RPM, 10 minutes) et resuspendus dans Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) (Life Technologies) supplémenté avec 10% de FBS et à une densité d'environ 33,000 cellules par millilitre (ml). Ces derniers furent purifiés davantage par adhérence sur des pétris de 35 mm (millimètre) à une suspension de 2 ml par pétris pendant 1 heure (h) d'incubation à une température de 37 degrés Celsius (°C) et avec 5% de

CO₂. Les cellules furent traitées par la suite avec les médicaments pour une durée de 4 h à 37°C, rincées avec du PBS et observées en utilisant la microscopie à transmission et à fluorescence.

Les traitements in vivo de quinacrine consistaient en 2 injections intrapéritonéales ; 40 ou 80 milligrammes (mg)/kilogrammes (kg) à deux reprises, à 24 h d'intervalles, avec le sacrifice 24 h après la dernière administration. Les souris du groupe témoin avaient reçu le véhicule, 100 microlitres (µl) d'une solution saline chauffée. Les dosages administrés furent déjà documentés et bien tolérés chez les souris (Gorbachev et coll., 2007). Les souris furent utilisées afin de répondre à trois objectifs ; dont la détection de la fluorescence de la quinacrine dans les organes fraîchement isolés (observés avec stéréomicroscope à fluorescence, Leica, modèle MZ APO ; filtres : excitation 480 nanomètres (nm)/40 nm, émission 510 nm, couplé à la caméra Olympus DP73) ; la quantification de la fluorescence de la quinacrine dans une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) 1 Normal (N) dans des extraits des organes et les immunobuvardages pour la protéine p62/SQSTM1 et LAMP2 à partir d'homogénats de tissus de poumons. Les organes des souris furent homogénéisés avec un mortier et pilon dans une solution de 150 millimolaire (mM) de chlorure de sodium (NaCl), 1% de Triton X-100, 0,1% de laurylsulfate de sodium (SDS), 0,5% de désoxycholate de sodium, 50 nanomolaire (nM) de trishydroxyméthylaminométhane (Tris) et complétée avec une tablette de Complete *Mini Protease inhibitor cocktail* (Roche) par 10 ml. Cent microgrammes de protéines furent chargés dans chacun des puits des gels.

1.1.2 Agents pharmacologiques

La bafilomycine A1 fut achetée de *LC Laboratories* (Woburn, MA). Les autres agents pharmacologiques furent obtenus de *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO) : le médicament cationique fluorescent modèle, le dichlorure de quinacrine, l'inhibiteur de la macroautophagie, la spautin-1 (Liu et coll., 2011 ; Shao et coll., 2014), l'ionophore H⁺, le monensin (Gil et coll., 2012), l'inhibiteur des « *organic cation transporter* » 1-3 (OCT), le décynium-22 (Hayer-Zillgen, Brüss et Bönisch, 2002), l'inhibiteur de la

glycoprotéine P, l'élacridar (GF120918) (Rautio et coll., 2006) et autres inhibiteurs de transporteurs membranaires, la gemfibrozil, la verapamil, la β -estradiol et la cétirizine.

1.1.3 Construction du vecteur LAMP1-mCherry

En premier lieu, la séquence correspondante à la protéine humaine LAMP1 fut ampliée à partir d'un vecteur de LAMP1 (don du Dr Esteban C. Dell'Angelica, UCLA, Department of Human Genetics ; Falcòn-Pérez et coll., 2005) par la technique de la réaction en chaîne par polymérase (PCR). Les amorces utilisées étaient les suivantes : 5'-C GTT TAA ACG GGC CCT ATG GCG GCC CCC GGC AGC-3' (sens) et 5'-TTG CTC ACC GCG CCG GTG GAG CCT GTG-3'. Par la suite, la séquence codante pour la protéine mCherry fut à son tour amplifiée avec les amorces suivantes : 5'-CCG GCG CGG TGA GCA AGG GCG AGG AG-3' (sense) et 5'-TTG GTA CCG AGC TCG TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT GC-3' (antisense). Après leur purification, ces deux fragments furent insérés dans la le vecteur pcDNA3.1(-) digéré par Xbal et BamHI en utilisant la méthode d'assemblage de Gibson (Gibson et coll., 2009). La génération du vecteur LAMP1-mCherry fut confirmée par séquençage.

1.2 Méthodes

1.2.1 Transfection et vecteurs

Les fibroblastes dermiques de souris furent transfectés avec différents vecteurs afin d'étudier la localisation subcellulaire de la quinacrine et la signalisation induite par le traitement de ce médicament cationique. Les vecteurs codaient pour « *Rasrelated protein* » Rab5, Rab7 et Rab7-GTP fusionnés avec la protéine fluorescente mCherry. Ces vecteurs furent des gracieusetés des Drs Robert Lodge (Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Montréal, Canada) et Michael J. Tremblay (CHU de Québec, Québec, Canada). Le réticulum endoplasmique fusionné avec la protéine rouge fluorescente (ER-RFP ; Klee et Pimentel-Muiños, 2005) était un don du Dr Felipe X. Pimentel-Muiños, Universidad de Salamanca-CSIS, Salamanca,

Espagne. Le vecteur codant pour la forme myc-fusionnée au facteur de transcription EB (TFEB) fut acheté d'Origene (numéro de catalogue RC207153). Les vecteurs d'expression furent transfectés pour une durée de 24 h ou 48 h en utilisant le protocole de transfection avec le polyéthylènimine (PEI) (Morissette et coll., 2008b) ou en utilisant la méthode de Roche avec *X-tremeGENE* pour la transfection du TFEB.

Les cellules HEK 293a furent transfectées avec des vecteurs de différents transporteurs membranaires afin d'étudier le transport de la quinacrine. Ces vecteurs codaient pour les formes myc-fusionnées des transporteurs OCT-1 à 3. Une confirmation de la transfection fut démontrée par immunobuvardage et par le transport d'un substrat propre aux transporteurs.

1.2.2 Microscopie

La fluorescence intrinsèque verte de la guinacrine fut exploitée afin d'étudier sa distribution subcellulaire après des traitements à 37°C à des temps variés (30 minutes à 4 h) dans les fibroblastes dermigues de souris. En plus de la fluorescente verte de la quinacrine, la colocalisation des protéines fluorescentes rouges fut aussi observée dans certaines expériences. Un marquage mitochondrial (25 nM MitoTracker Red CMXRos, Invitrogen) fut ajouté dans le milieu de culture des FDS 15 minutes avant l'observation en microscopie. Les cellules fixées et perméabilisées furent soumises à l'immunofluorescence afin d'observer la présence de l'α-actine (anticorps monoclonal, clone 1A4, Sigma-Aldrich, dilution 1:100 et révélé avec l'anticorps « anti-mouse » IgG polyclonal couplé avec l'AlexaFluor-488 (Molecular Probes) et la distribution subcellulaire du TFEB fusionné avec myc (anticorps monoclonal anti-myc, clone 4A6, couplé avec AlexaFluor-488, Millipore). Toutes les photos microscopiques furent prises avec l'appareil Olympus BX51 (Center Valley, PA) couplé à une caméra digitale CoolSnap HQ (Photometrics, Tucson, AZ). Les filtres utilisés pour la quinacrine et AlexaFluor-488 : excitation 460-500 nm, émission 510-560 nm ; pour mCherry, RFP et Mitotracker Red : excitation 525-555 nm, émission 600-660 nm.

En plus de démontrer sa distribution subcellulaire chez les fibroblastes dermigues de souris, la quinacrine s'accumule aussi chez les cellules HEK 293a. Les cellules furent traitées avec la bafilomycine A1 (100 nM) ou avec le véhicule (DMSO) pour une durée de 30 minutes et ensuite elles furent traitées avec la quinacrine (1 µM et 2.5 µM) pour une durée de 4 h. Afin de confirmer la transfection des HEK 293a avec vecteurs, celle-ci furent à les différents soumises des expériences d'immunofluorescences avec l'anticorps monoclonal anti-myc (clone 4A6, couplé avec AlexaFluor-488. Millipore). Toutes les photos microscopiques furent prises avec l'appareil Olympus BX51 (Center Valley, PA) couplé à une caméra digitale CoolSnap HQ (Photometrics, Tucson, AZ). Les filtres utilisés pour la quinacrine : excitation 460-500 nm, émission 510-560 nm.

1.2.3 Transport cellulaire

L'accumulation cellulaire de la guinacrine chez les fibroblastes dermigues de souris fut déterminée par une légère variation du protocole utilisé par Marceau et coll. (2009). Le médicament en question fut ajouté aux flacons de 25 cm² confluents contenant 3 ml de milieu DMEM supplémenté avec 10% de FBS, 1% de L-glutamine et 1% de pénicilline-streptomycine. Plusieurs expériences furent entreprises avec des concentrations de médicament différentes et des temps d'incubation variés. L'accumulation de la guinacrine à la fin de l'incubation (37°C, 5% CO₂) fut déterminée à la suite de trois rinçages avec 3 ml avec du PBS, à un pH de 7.4 et à température pièce, pour ensuite dissoudre les cellules de souris dans 10 ml de NaOH 1 N. La fluorescence de la quinacrine fut analysée directement dans la solution de NaOH grâce au spectrophotomètre (FluoroLog tau-3 ; HORIBA JobinYvon Inc., Edison, NJ ou encore soit le Aminco Bowman Series 2) avec une comparaison à une courbe standard de concentrations variées de quinacrine dissoute dans une solution de NaOH 1 N (filtres : excitation 414 nm et émission 501 La fluorescence très faible des cellules de souris sans la présence de nm). quinacrine fut analysée et soustraite des valeurs expérimentales.

La même méthode expérimentale fut utilisée pour les organes extraits des souris traitées *in vivo* avec la quinacrine (40 mg/kg/jour intrapéritonéal pour 2 jours) ou avec une solution saline. Les organes en question furent homogénéisés avec un mortier et pilon dans une solution de NaOH 1 N (10 ml pour chaque organe individuel). L'autofluorescence ne pouvait pas être soustraite comme chez les fibroblastes dermiques de souris, mais fut quantifiée à partir de souris traitées avec la solution de saline.

Le transport de la guinacrine fut aussi étudié chez les cellules HEK 293a. Les cellules furent incubées avec la quinacrine pour une durée de 30 minutes dans des plaques de 12 puits avec 2 ml de milieu correspondant. Trois séries d'expériences de transport furent effectuées avec les HEK 293a ; une série avec l'inhibiteur de la pompe V-ATPase : la bafilomycine A1, une seconde série avec l'inhibiteur des transporteurs OCT-1 à 3 : le décynium-22 et une troisième série avec les cellules HEK 293a transfectées avec les vecteurs des différents transporteurs (OCT-1 à 3). L'accumulation cellulaire de la quinacrine dans chacune des expériences fut déterminée à la suite de trois rinçages de 3 ml avec du PBS, à un pH de 7.4 et à température pièce, pour ensuite dissoudre les cellules dans 2,5 ml de NaOH 1 N. Ensuite, 1 ml de ce volume fut ajouté dans 3 ml de NaOH 1 N pour former une dilution 1:10. La fluorescence de la guinacrine fut analysée avec 1 ml de cette dilution de NaOH grâce au spectrophotomètre avec une comparaison à une courbe standard de concentrations variées de quinacrine dissoute dans une solution de NaOH 1 N. La fluorescence des cellules HEK 293a sans la présence de guinacrine, comme chez les cellules de souris, fut analysée et soustraite des valeurs expérimentales.

Le MPP⁺ (1-méthyl-4-phényl pyridinium), N-[méthyl-³H], avec une activité spécifique de 80Ci/nmol, fut obtenu d'*American Radiolabeled Chemicals, Inc.* (St-Louis, MO). Cet agent pharmaceutique est un substrat pour l'OCT-1, 2 et 3 (Nies et coll., 2011). Brièvement, les cellules HEK 293a furent cultivées dans des plaques à 24 puits et transfectées avec des vecteurs codants pour les OCTs ou avec des vecteurs vides.

Les cellules furent ensuite rincées et les puits furent remplis avec 1,25 ml de milieu DMEM sans sérum préchauffé contenant 100 nM [³H] MPP⁺. Les cellules HEK 293a furent incubées à 37°C pendant 30 minutes et rincées 3 fois avec du PBS froid et finalement dissous dans 1 ml de NaOH 0,1 N. Les suspensions résultantes ont été comptées par scintillation.

1.2.4 Immunobuvardage

Les fibroblastes dermiques de souris dans des flacons confluents de 25 cm² furent soumis à des traitements de quinacrine (24 ou 48 h), d'agents pharmacologiques et un sevrage de sérum pour observer les effets sur les protéines autophagiques (LC3, p62/SQSTM1) et sur la lysosomogénèse (LAMP1 et LAMP2). Les cellules extraites furent ajoutées dans le tampon de lyse bouillant, qui contenait 10 mmol/L de Tris, pH de 7.4, 1,0 mmol/L d'orthovanadate de sodium (Na₃VO₄) et 1,0% de SDS. Les lysats furent ensuite centrifugés à 15,000 g pour une durée de 5 minutes et ensuite incubés à une température de 95°C pour une durée de 5 minutes. La concentration totale de protéines présentent dans les échantillons fut déterminée en utilisant le kit *BCA Protein Assay* (PierceTM).

Quinze microgrammes de protéines totales furent chargés dans chaque puits du gel de polyacrylamide avec du laurylsulfate de sodium de l'électrophorèse (SDS-PAGE) et par la suite transférés sur une membrane de fluorure de polyvinylidène (PVDF). Certains immunobuvardages ciblaient des protéines des fibroblastes dermiques et d'autres ciblaient des protéines des organes de souris. L'anticorps contre la protéine humaine LC3B (Novus ; dilution 1 : 3,000) fut utilisé pour démontrer la forme cytosolique LC3 I (19 kDa) et la forme clivée et liée à la membrane LC3 II (17 kDa) sur un gel SDS-PAGE de 15% (Morisette, Lodge et Marceau, 2008a). Des gels de 9% furent utilisés afin de faire la séparation des protéines p62/SQSTM1, LAMP1, LAMP2 et β -actine des échantillons. L'anticorps monoclonal contre la protéine autophagique p62/SQSTM1 fut commandé de *Cell Signaling Technology* (numéro de catalogue : 5114). Les glycoprotéines lysosomales/endosomales LAMP1 et LAMP2 furent détectées dans les échantillons protéiques de souris en utilisant les

anticorps monoclonaux 1D4B et ABL-93 respectivement. Chacun de ces deux anticorps, dilués 1 : 1,000, étaient obtenus de *Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA*. Toutes les réactions comprenaient l'utilisation d'anticorps secondaires couplés à une peroxydase de raifort (HRP) et révélées avec un substrat luminescent de la trousse *Western Lighting, Perkin Elmer* et exposé sur des films *CL-X Posure (Thermo Scientific)*.

Un chargement égal de protéines dans chacun des puits fut démontré avec l'aide d'une migration parallèle pour la β -actine (dilution de 1 : 50,000, anticorps monoclonal Sigma-Aldrich) lors des autres immunobuvardages. L'intensité du signal des immunobuvardages était numérisée à partir des films photographiques : les intensités moyennes des pixels (échelle de 0 à 255) des sélections rectangulaires correspondantes aux protéines migrées furent évaluées à partir du logiciel Photoshop (version 6, Adobe, San Jose, CA). Le signal du fond fut soustrait de chaque échantillon.

Afin de confirmer la transfection des vecteurs codant pour les transporteurs membranaires OCT-1 à 3, une série d'expériences d'immunobuvardages fut effectuée avec les HEK 293a. Les extraits protéiques des cellules HEK 293a furent soumis à un protocole similaire aux extraits protéiques des fibroblastes dermiques de souris. L'anticorps monoclonal anti-myc, clone 4A6, couplé avec AlexaFluor-488 fut utilisé comme indiqué par le manufacturier (Millipore).

1.2.5 Isolation de l'ARN

Les fibroblastes dermiques de souris furent ensemencés dans des plaques à 6 puits pour une durée de 2 jours avant leur stimulation. Une quantité maximale d'ARN fut extraite en utilisant le protocole de Quiazol du manufacturier (Quiagen Inc., Mississauga, ON, Canada). Après 24 h de traitements avec des concentrations variées de quinacrine, les FDS furent rincés à deux reprises avec du PBS à température pièce pour ensuite ajouter 1 ml de Quiazol dans chaque puits. Une fois

détachées, les cellules furent ajoutées dans un tube contenant 200 µl de chloroforme. Après avoir bien mélangé les tubes, ceux-ci furent centrifugés à 12,000 g pour une durée de 15 minutes à 4°C. La phase aqueuse (approximativement 400 µl) fut transférée dans un tube Eppendorf de 1,5 ml avec un volume égal d'isopropanol. Après une incubation d'une durée de 10 minutes à température pièce, les échantillons furent centrifugés à 12,000 g à 4°C pour une seconde durée de 10 minutes. Après la centrifugation, le surnageant fut éliminé et le culot d'ARN fut rincé avec 500 µl d'éthanol 70% pour ensuite être recentrifugé pour une durée de 5 minutes à 12,000 g à une température 4°C. Finalement, le culot fut séché pour une durée de 10 à 15 minutes pour ensuite être resuspendu dans l'eau libre d'ARNase. La quantification de la solution d'ARN fut effectuée avec l'appareil Biodrop µLite (*Isogen, Life Science*).

1.2.6 PCR quantitative

Le niveau de transcription des ARN messager (ARNm) dans les fibroblastes dermiques de souris fut mesuré par la méthode de PCR quantitative décrite par Laflamme et coll. (2014). En premier lieu, une transcription inverse fut effectuée avec 1 µg d'ARN total en utilisation les instructions fournies par le *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit* (Roche Applied Science, Laval, QC, Canada). Les amplifications des brins d'ADN complémentaires (ADNc) furent effectuées dans le *Rotor-Gene Q* avec le logiciel *Q-series* version 2.0.2 (Quiagen Inc., Mississauga, ON, Canada). Une série de 35 cycles fut établie à 95°C pour une durée de 17 secondes, ensuite à 58°C pendant 25 secondes et finalement à 72°C pour une durée de 25 secondes. Chacune des réactions contenait 40 ng de ADNc, 2 µl de tampon 10x, 100 µM de dNTPs, 0,1 unité d'ADN polymérase Taq (Roche Applied Science) et *SYBR Green I* (Life Technologies Inc., Burlington, ON, Canada) dilué à 1 : 30,000.

Pour chacun des gènes murins d'intérêts, des amorces spécifiques furent établies à partir de la méthode décrite par Laflamme et coll. (2014). Pour le gène codant pour LAMP1, les amorces suivantes furent utilisées : 5'-ACTGGTAACAACGGAACCTG-3' (sens) et 5'-ACACATTGGGGTTAGGAACA-3' (anti-sens). Pour le gène codant pour LAMP2, les amorces suivantes furent utilisées : 5'-CTAGGAGCCGTTCAGTCCAA-3' (sens) et 5- CTTGCAGGTGAATACCCCAA-3 (anti-sens). La glycéraldéhyde 3-phosphate déhydrogénase (GAPDH) fut utilisée comme notre gène de référence. Les amorces utilisées pour ce dernier furent : 5'-AACTTTGGCATTGTAGAAGG- 3' (sens) et 5'-ACACATTGGGGTTAGGAACA-3' (anti-sens).

1.2.7 Analyses statistiques

Tous les résultats numériques furent présentés comme la moyenne ± l'erreur type. Les données obtenues par le transport de la quinacrine avec des concentrations variées à des temps d'incubations fixes furent ajustées au moyen d'une régression non linéaire selon l'équation de Michaelis-Menten en utilisant une méthode des moindres carrés (Prism 4.0; GraphPadSoftware Inc., San Diego, CA, USA). Les valeurs des Km et des Vmax furent aussi calculées avec l'aide de cette méthode. Les données numériques obtenues par la densitométrie des immunobuvardages, des intensités des cytofluométries, les activités enzymatiques et du transport MPP⁺ furent comparées avec l'aide d'ANOVA suivi du test de Bonferroni avec comparaisons multiples afin de faire la comparaison entre des paires de données ou le test de Dunnett afin de comparer les groupes expérimentaux avec un groupe témoin commun. Lorsque les valeurs n'étaient pas normalement distribuées, le test non paramétrique ANOVA Kruskal-Wallis et le test de comparaison multiple de Dunnett furent utilisés. L'effet qualitatif des traitements sur la distribution subcellulaire (cytosolique ou nucléaire) du facteur de transcription EB (TFEB) fut évalué pour chacun des fibroblastes dermiques de souris individuels dans les microphotographies et la proportion des cellules affectée fut analysée par le test statistique χ^2 . L'intensité de la fluorescence des extraits des organes de souris traitées avec soit la quinacrine ou la solution saline fut comparée avec l'aide du test de Student (Test t). Tous les calculs furent effectués avec l'aide du logiciel InStat 3.05, GraphPad Software (San Diego, CA, USA).

2. L'effet cytostatique et cytotoxique des médicaments cationiques lysosomotropiques : rôle de la liposolubilité et du flux autophagique et effet de l'ablation du cholestérol

2.1 Matériel

2.1.1 Culture cellulaire

Lors de la réalisation de cette étude, 4 lignées cellulaires furent utilisées. La lignée dérivée d'un mélanome humain, M21, fut un cadeau Dr Eric Petitclerc (Héma-Québec, Québec, Canada). Elle fut originalement obtenue du Dr David Cheresh (The Scripps Research Institute, San Diego, CA, USA). Elle fut maintenue dans le milieu DMEM supplémenté avec 5% de FBS, 1% de L-glutamine et 1% de La lignée M21 est tumorigène chez des souris pénicilline-streptomycine. immunodéficientes (McMahon et coll., 2001). La grande majorité des cellules de mélanomes sont très radiorésistantes et expriment généralement une forme non mutée de la protéine p53. Les agents endommageant l'ADN induisent une accumulation de p53, mais ne provoquent pas le processus apoptotique, y compris dans la lignée M21 comme modèle cellulaire (Bao et Strömblad, 2004). La lignée de cellules épithéliales de reins humains (HEK 293a) fut obtenue originalement de Sigma-Aldrich et fut maintenue dans le milieu de culture DMEM supplémenté avec 10% de FBS, 1% de L-glutamine et 1% de pénicilline-streptomycine. Le conseil institutionnel d'éthique de la recherche approuva l'utilisation anonyme de segments de cordons ombilicaux humains obtenus par césariennes électives. Les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVECs) furent isolées par la digestion à la collagénase des veines ombilicales humaines des sections de cordons. Les cellules furent maintenues dans le milieu Endothelial Cell é Medium (EGM, Lonza-Clonetics, Basel, Suisse) supplémenté avec des suppléments de croissance (2% FBS) et des antibiotiques (Koumbadinga et coll., 2010). Les cellules leucémiques monocytaires humaines (U937) furent isolées originalement d'un lymphome histiocytaire d'un patient mâle âgé de 37 ans. Elles furent maintenues dans le milieu RPMI 1640 (GIBCO) supplémenté avec 10% FBS, 1% L-glutamine,

1% pénicilline-streptomycine et 10 mM d'acide 4-(2-hydroxyéthyl) -1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES). Cette lignée est p53-nulle en raison d'une grande délétion dans les deux copies du gène codant pour la protéine p53 (Shiohara et coll., 1994 ; Oliveira et coll., 1997).

2.1.2 Produits pharmacologiques

Les différentes lignées cellulaires furent traitées avec une série de triéthylamines substituées (s-Et₃N) pour accomplir une variété d'expériences. La série comprenait la procainamide, la lidocaïne, l'hydroxychloroquine, la chloroquine, la quinacrine et l'amiodarone (Sigma-Aldrich). Les inhibiteurs β-cyclodextrine, lovastatine et géranylgéranyl-pyrophosphate, furent obtenus de Sigma-Aldrich. Pour l'étude de la cytotoxicité des médicaments cationiques, le colorant DRAQ7 fut obtenu de *Cell Signaling Technology*. Afin d'étudier l'effet des médicaments cationiques sur le cycle cellulaire, le Hoechst 33342 fut obtenu de Sigma-Aldrich. La transferrine conjuguée avec l'AlexaFluor-594 fut obtenue de Sigma-Aldrich afin d'étudier la fonction d'endocytose.

2.2 Méthodes

2.2.1 Prolifération et décomptes cellulaires

L'étude de l'effet antiprolifératif des médicaments s-Et₃N est basée sur un essai prolifératif utilisé antérieurement. Cinquante mille cellules furent ensemencées avec 2 ml de milieu de culture propre au type de cellule en question dans des pétris de 35 mm (obtenus de *Starstedt*) au temps zéro. Vingt-quatre heures après l'ensemencement, les médicaments cationiques à concentrations variées furent ajoutés dans le milieu de culture. Au temps 72 h, les cellules furent rincées avec du PBS 1X et ensuite détachées avec l'utilisation de la trypsine+EDTA (*ThermoFisher Scientific*), à l'exception des cellules non adhérentes U937. Une fois les cellules décollées, les décomptes cellulaires furent effectués avec le Cellometer® mini (*Nexcelom Bioscience*, Lawrence, MA). L'effet antiprolifératif des six médicaments cationiques, l'amiodarone, la quinacrine, la chloroquine, l'hydroxychloroquine, la

lidocaïne et la procainamide, fut étudié sur les quatre lignées cellulaires, la lignée de mélanome humain M21, la lignée leucémique monocytaire humaine U937, la lignée de cellules de reins humains HEK 293a et les cellules de la veine ombilicale humaine HUVECs.

Une modification de l'essai de prolifération fut effectuée pour la lignée cellulaire leucémique des U937. Cinquante-mille cellules de U937 furent incubées en présence des médicaments s-Et₃N avec des cotraitements consistant en inhibiteurs du réseau de signalisation du mévalonate afin d'étudier leur influence sur l'effet antiprolifératif. Ces cotraitements consistaient en la β -cyclodextrine 1 mM, la lovastatine 100 nM et la géranylgéranyl-pyrophosphate 10 μ M. Après une période d'incubation de 48 h, les décomptes cellulaires furent effectués.

2.2.2 Microscopie

La distribution subcellulaire de la quinacrine fut évaluée chez les cellules leucémiques (U937) après une période d'incubation entre 0 et 3 h à une température de 37° C. Les cellules furent incubées dans un *Eppendorf Thermomixer* à une concentration de $1x10^{6}$ cellules par ml. Un prétraitement avec l'inhibiteur de la pompe V-ATPase, la bafilomycine A1, 100 nM pour une durée de 30 minutes était suivi par une incubation avec la quinacrine. Après les traitements, les cellules furent centrifugées à 12,500 RPM pour une durée de 30 secondes à température pièce. Le surnageant fut aspiré et les cellules furent resuspendues et rincer avec 1 ml de *Hank's balanced salt solution* (HBSS) préchauffé à 37° C. Les cellules furent centrifugées une deuxième fois, avec les mêmes ajustements, pour ensuite être resuspendues dans 25 µl du milieu de culture RPMI 1640 + 1% pénicilline-streptomycine. Finalement, 5 µl de la suspension a été déposé sur une lame microscopique pour être observées avec la caméra *Coolsnap HQ digital* couplée au microscope *Olympus BX51* (filtres pour la fluorescence de la quinacrine : excitation 460-500 nm, émission 510-560 nm).

2.2.3 Cytométrie en flux (FACS)

Une suspension de 1x10⁶ cellules U937 fut traitée avec le médicament fluorescent quinacrine pour une durée soit de 1 h ou 48 h dans leur milieu de culture habituel. Un prétraitement avec la bafilomycine A1 100 nM était effectué 30 minutes avant le traitement de 1 h avec la guinacrine. Deux cotraitements optionnels furent ajoutés au traitement de 48 h avec la quinacrine, dont la β-cyclodextrine 1 mM ou la lovastatine 100 nM. Après les traitements, les cellules furent centrifugées à 12,500 RPM pour une durée de 30 secondes à température pièce pour ensuite aspirer le surnageant. Les cellules ont été resuspendues dans 1 ml de HBSS préchauffé à 37°C et centrifugées une deuxième fois avec les mêmes réglages. Elles furent ensuite suspendues dans 250 µl de HBSS préchauffé à 37°C. Les cellules furent soumises à une analyse par cytofluométrie de la capture du médicament quinacrine décrite par Roy et coll. (2013). Les analyses cytofluométriques furent effectuées à l'aide du BD SORP LSR II cell analyser, BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ; réglage de fluorescence FITC). Il fut possible dans les expériences suivantes d'étudier la fluorescence verte de la quinacrine parallèlement avec d'autres margueurs fluorescents.

Afin d'évaluer leur cytotoxicité, une suspension de 1×10^6 cellules U937 furent traitées avec des s-Et₃N pour une durée de 24 ou 48 h dans leur milieu de culture habituel. Après les traitements, approximativement 50,000 cellules furent centrifugées à 12,500 RPM pour une durée de 30 secondes à température pièce. Après avoir aspiré le surnageant, les cellules étaient rincées avec 1 ml de HBSS préchauffé à 37°C. Après le rinçage, le marqueur d'ADN, DRAQ7 (*Cell Signaling Technology*) fut ajouté à une concentration de 3 µM. Les cellules furent incubées avec le DRAQ7 pour une durée de 2 minutes à 37°C dans *Eppendorf Thermomixer* à 350 RPM. Après les traitements, les cellules furent analysées comme indiqué (Ex/Em : 646/681 nm).

Afin d'évaluer l'effet sur le cycle cellulaire des s-Et₃N, des suspensions de 1x10⁶ cellules U937 ou des cultures d'HUVEC confluentes à 80% furent traitées pour une

durée de 48 h. Après les traitements, les deux types de cellules furent incubés avec le colorant de l'ADN Hoechst 33342 (10 µg/ml ; Sigma-Aldrich) pour une durée de 1h à 37°C. Après l'incubation, les HUVECs furent détachées avec l'aide de la trypsine+EDTA (*ThermoFisher Scientific*) pendant qu'approximativement 300,000 cellules U937 furent récupérées. Les deux types de cellules ont été centrifugé à température pièce ; les cellules U937 à 12,500 RPM pour une durée de 30 secondes et les HUVECs à 1,200 RPM pendant 5 minutes. Après avoir aspiré le surnageant, les cellules furent rincées avec 1 ml de HBSS préchauffé à 37°C. Après une deuxième centrifugation, les deux types de cellules furent resuspendus dans 250 µl de HBSS préchauffé à 37°C. L'analyse par cytofluorométrie fut effectuée comme indiqué (Ex/Em : 346/460 nm).

La fonction d'endocytose des cellules U937 à la suite de traitements avec les s-Et₃N fut étudiée avec l'aide de la transferrine-AlexaFluor-594. Brièvement, une suspension de 1x10⁶ cellules U937 était traitée avec certains s-Et₃N pour une durée de 24 h avec l'option de cotraitement par la β -cyclodextrine 1 mM. Après les traitements, approximativement 200,000 cellules ont été récupérées et incubées dans *Eppendorf Thermomixer* à 350 RPM pour une durée de 15 minutes avec le marqueur transferrine-AlexaFluor-594 à 37°C. À la suite des traitements, les cellules furent centrifugées (12,500 RPM pour une durée de 30 secondes) et rincées avec le HBSS préchauffé à 37°C. Le culot fut suspendu dans 250 µl de HBSS préchauffé à 37°C. L'analyse par cytofluorométrie était effectuée comme indiqué (Ex/Em : 590/617 nm).

2.2.4 Immunobuvardage

Les cellules leucémiques U937 furent analysées selon une variation d'une technique utilisée par Parks et coll. (2015). Une extraction de 3x10⁵ cellules U937 fut effectuée comme décrit par Roy et coll. (2013). Les cellules furent auparavant traitées pour une durée de 6 h avec une variété de médicaments cationiques afin d'étudier leur effet sur l'accumulation de la protéine autophagique LC3B. Les extraits des cellules furent migrés sur un gel 15% SDS-PAGE et par la suite transférés sur une

membrane PVDF. L'anticorps polyclonal du lapin anti-LC3B humain (Novus ; dilution 1 : 3,000) fut utilisé pour observer l'effet sur la forme cytosolique LC3 I (18 kDa) et la forme lipidique liée à la membrane LC3 II (16 kDa) (Morissette et coll., 2008a).

En plus d'étudier l'effet des s-Et₃N sur la protéine autophagique LC3B, l'effet sur une réponse apoptotique tardive médiée par la caspase-3, c'est-à-dire le clivage de poly(ADP-ribose) -polymérase I (PARP1), fut aussi étudié. L'anticorps polyclonal de lapin anti-PARP1, provenant de *Cell Signaling* (cat. #9542, dilution 1 : 1,000), fut utilisé afin d'observer le clivage apoptotique de cette protéine.

En plus des cellules leucémiques U937, le niveau basal de densité des lysosomes et de l'autophagie des trois autres lignées cellulaires furent aussi étudiés. Le lysat des cellules M21, des cellules HEK 293a et de HUVECs furent centrifugés à 15,000g pendant 5 minutes et ensuite incubés à 95°C pour une durée de 5 minutes. Un gel SDS-PAGE de 9% fut utilisé avec l'aide des anticorps spécifique contre les protéines p62/SQSTM1, LAMP1, P53 et β-actine. La glycoprotéine lysosomale/endosomale LAMP1 fut détectée dans les lysats cellulaires avec l'aide de l'anticorps monoclonal de souris H4A3 (*Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA*. Dilution 1 : 1,000). L'anticorps monoclonal de lapin spécifique pour la protéine autophagique p62/SQSTM1 fut obtenu de *Cell Signaling Technology* (dilution 1 : 1,000. Cat. # 5114). Finalement, l'anticorps monoclonal de souris spécifique à la protéine p53 (clone BP53-12, cat. #P5813) fut obtenu de Sigma-Aldrich et une dilution 1 : 1,000

La forme phosphorylée et non phosphorylée de la protéine du rétinoblastome (pRB) furent étudiées avec l'aide des anticorps anti-phospho-pRB et anti-pRB. L'anticorps de lapin spécifique pour la forme phosphorylée de la protéine du rétinoblastome, Ser^{807/811}, fut utilisé avec une dilution 1 : 1,000. L'anticorps de souris spécifique pour la forme non phosphorylée du pRB, clone 4H1, fut utilisé avec une dilution de 1 :

2,000. Ces deux anticorps furent obtenus de *Cell Signaling Technology* (cat. #8516 et #9303 respectivement).

Une quantité égale de protéine dans les puits était confirmée par l'immunobuvardage de la protéine β -actine. L'anticorps monoclonal de souris obtenu de *Sigma-Aldrich* fut utilisé avec une dilution 1 : 50,000. Toutes les réactions utilisent les anticorps secondaires couplés à une peroxydase de raifort (HRP) et révélées avec un substrat luminescent de la trousse *Western Lighting, Perkin* Elmer. Les réactions ont été exposé sur des films *CL-X Posure* (*Thermo Scientific*).

2.2.5 Détermination du cholestérol chez les cellules U937

La détermination du cholestérol (le cholestérol libre et total) fut établie à l'aide du *Cholesterol Quantitation Kit* obtenu chez Sigma-Aldrich (cat. #MAK043). Brièvement, 1x10⁶ cellules U937 furent récupérées après 48 h de traitements avec certains s-Et₃N. Les lipides furent extraits des cellules avec une solution chloroforme : isopropanol : IGEPAL CA-630 (7 :11 :0.1). Les échantillons furent centrifugés à 13,000g pour une durée de 10 minutes à température pièce. Le surnageant était par la suite transféré dans un tube *Eppendorf* de 1,5 ml. Les lipides furent séchés à une température de 50°C afin d'éliminer les résidus de solvants organiques. Le *Cholesterol Assay Buffer* du kit était utilisé pour dissoudre le culot des lipides. La concentration du cholestérol des cellules a été analysée avec l'utilisation d'une plaque à 96 puits et avec une comparaison à une courbe standard de 0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 et 0,5 ng/puits en fluorométrie. Les analyses ont été effectuées avec l'appareil *TECAN Infinite® M200 series reader* (Morrisville, NC ; Ex/Em : 535/587 nm).

2.2.6 Analyses statistiques

Les résultats numériques étaient présentés en moyenne ± l'erreur type. Les ensembles de données numériques obtenus par la densité des immunobuvardages, par l'intensité de la cytofluorométrie, la concentration du cholestérol, de

l'accumulation du marqueur DRAQ7 et les valeurs des décomptes cellulaires furent généralement comparés par ANOVA suivie d'un test de Dunnett afin d'effectuer une comparaison entre les groupes expérimentaux et la valeur du contrôle commun. Le de Student (Test *t*) était utilisé afin de comparer l'effet d'une seule intervention pharmacologique sur les cellules traitées de manière uniforme. Une présentation par régression linéaire et le coefficient de corrélation r de Pearson furent également utilisés pour établir une corrélation entre la puissance antiproliférative des médicaments cationiques et d'autres paramètres. Tous les calculs furent effectués en utilisant le logiciel *InStat 3.05* et *GraphPad Software* (San Diego, CA).

RÉSULTATS

1. Inhibition du flux autophagique et de la lysosomogénèse à la suite de la séquestration du médicament cationique quinacrine dans un modèle murin

1.1 Transport de la quinacrine dans les fibroblastes de souris

Les fibroblastes dermiques primaires des souris C57BL/6 étaient uniformément positifs pour l'α-actine du muscle lisse (immunofluorescence, Fig. 9 A) et sont donc identifiés plus précisément comme myofibroblastes. Comme démontré chez une variété de types cellulaires (Marceau et coll., 2009 ; Marceau, Roy et Bouthillier, 2014 ; Roy et coll., 2013), ces fibroblastes dermiques de souris accumulent la quinacrine sous forme de granules et de vacuoles périnucléaires et cytosoliques à la suite de traitements avec une variété de concentrations (250 nM – 5 μ M). Cette accumulation fut démontrée par la fluorescence verte naturelle du médicament (Fig. 9 B). Le marquage nucléaire de la quinacrine était négligeable avec les concentrations utilisées. Le cotraitement des fibroblastes dermiques avec l'inhibiteur de la pompe V-ATPase, la bafilomycine A1, abolit quasi totalement l'accumulation du médicament (Fig. 9 B).

A. C57BL/6 fibroblastes dermiques de souris Immunofluorescence pour l'α-actine, 100 x



B. Traitements de 4 h Épifluorescence verte, 400 x





Des protéines fluorescentes et le marqueur *Mitotracker red* furent utilisés afin d'identifier les organelles qui accumulaient la quinacrine dans les fibroblastes dermiques de souris (Fig. 10). La fluorescente verte de la quinacrine était généralement co-localisée avec les protéines de fusion du Rab7 et LAMP1, mais était aussi occasionnellement observée avec le Rab5 (un marqueur endosomal précoce). Par contre, une construction activée « *GTP-locked* » de Rab5 conjugué avec une protéine fluorescente verte causait une localisation particulière de la quinacrine ; le médicament était à l'intérieur des vacuoles géantes et les protéines rouges les bordaient (Fig. 10). Ces résultats indiquent une diversité des organelles qui accumulent les médicaments cationiques sous l'effet de la pompe V-ATPase.

La quantification de la fluorescence de la quinacrine dans les extraits de fibroblastes dermiques de souris permettait une caractérisation plus détaillée de son transport dans les cellules pour une durée de 4 h (Fig. 11). La quinacrine, à faible concentration de 2.5 µM, était accumulée par les cellules et son transport était saturé après une durée de seulement 60 minutes. Un cotraitement avec la bafilomycine A1 inhiba l'accumulation de la quinacrine peut importe la période d'incubation. L'inhibition semblait plus complète tardivement comme si l'inhibiteur avait un effet progressif sur le pH des organelles acides des fibroblastes dermiques de souris (Fig. 11 A). Chez les FDS traités avec la quinacrine pour une durée de 2 h, une quantité significative du médicament fut relâchée suite à l'ajout de la bafilomycine A1, mais non pas après des rinçages avec le milieu de culture. La rétention du médicament cationique est importante en l'absence de l'inhibiteur. L'accumulation de la quinacrine pour une période de 30 minutes suit une cinétique hyperbolique avec un K_m de 9.8 µM (8.7 µM chez les cellules du muscle lisse humain, Marceau et coll., 2009) et un V_{max} de 48.7 nmol/flacon/30 minutes (Fig. 11 B).



FIGURE 10 : Étude de la localisation de marqueurs à fluorescence rouge avec la quinacrine dans les fibroblastes dermiques de souris.



FIGURE 11 : Accumulation de la quinacrine dans les fibroblastes dermiques de souris mesurée par sa fluorescence intrinsèque.

Un flacon de fibroblastes dermiques de souris contient approximativement 276,000 \pm 43,000 cellules (n=6) qui correspondent à volume cellulaire de 5-7 µl. Il y a donc approximativement 5,000 fois la concentration de la quinacrine dans le volume cellulaire comparativement à la concentration dans le milieu de culture du flacon. La relation entre l'effet et la concentration de la bafilomycine A1 inhibant l'accumulation de la quinacrine chez les FDS fut étudiée à une concentration de 1 µM de quinacrine avec un temps d'incubation de 2 h (Fig. 12 A). Une puissance nanomolaire était observée pour la bafilomycine A1. L'ionophore des protons H⁺ monensin, qui perturbe les gradients de protons dans les organelles des cellules (Gil et coll., 2012), empêcha aussi l'accumulation de la quinacrine (Fig.12 A). Dans ces expériences, où seulement 1 µM de quinacrine fut utilisé, la quantité résiduelle mesurée en présence de 100 nM de bafilomycine A1 était inférieure à celle mesurée dans les cellules traitées avec une concentration plus élevée de quinacrine (comparaison entre Fig. 11 A et 12 A). Chez les expériences à court terme impliquant les

inhibiteurs des gradients de pH vacuolaire (Fig. 9, 11 A et 12 A) aucune cytotoxicité n'était observée. Lorsque la bafilomycine A1 était appliquée aux FDS 30 minutes avant l'ajout de la quinacrine, elle inhiba l'accumulation du médicament cationique pour toutes les concentrations de quinacrine utilisées (Fig. 12 B).

Comme observé chez d'autres modèles cellulaires, l'inhibiteur des transporteurs OCTs, le décynium-22 (Hayer-Zillgen, Brüss and Bönisch, 2002) échoua à modifier le transport de la quinacrine dans les fibroblastes dermiques de souris après une période d'incubation de 30 minutes (Fig. 12 B). L'inhibiteur de la glycoprotéine P, l'élacridar (GF120918) ne modifia pas le transport de la quinacrine chez les FDS (Fig. 12 B). Une panoplie d'inhibiteurs de transporteurs membranaires de faible sélectivité, dont le gemfibrozil, le verapamil, le β -estradiol et la cétirizine, n'ont pas changé l'accumulation de la quinacrine chez les fibroblastes dermiques de souris (Fig. 12 C). Aux concentrations utilisées, le gemfibrozil inhibe la PGP (glycoprotéine P) l' « *organic anion-transporting polypeptide »* (OATP) 1B1 et l'OATP 1B3 (Joeong et coll., 2015 ; Seral et coll., 2003), le verapamil inhibe la PGP, l'OCT-1, l' «*organic zwitterions/cations transporters »*-1 et 2 (OCTN-1 et 2) (Salomon et coll., 2014), le β -estradiol inhibe la PGP, l'OCT-3 et l'OCT-1 (Hayer-Zillgen, Brüss et Bönisch, 2002) et la cétirizine inhibe la PGP, l'OCT-2 et l'OCTN-2 (Tsuroka et coll., 2006 ; Diao, Ekins et Polli, 2010).



FIGURE 12 : Effet d'agents inhibiteurs sur l'accumulation de la quinacrine dans les fibroblastes dermiques de souris.

(A) L'abolition de l'accumulation de la quinacrine en réponse à la bafilomycine et au monensin dans les fibroblastes dermiques de souris. Les valeurs expérimentales furent comparées avec l'ANOVA ($P < 10^{-4}$) et avec le test de Dunnett. Toutes les concentrations des 2 inhibiteurs produisent des inhibitions significatives. (B) L'effet de l'inhibiteur de la glycoprotéine-P, l'élacridar, l'inhibiteur des OCT-1 à 3, le décynium-22 et la bafilomycine A1 sur l'accumulation de la quinacrine chez les fibroblastes dermiques de souris. (C) L'effet d'inhibiteurs de transport membranaire sur l'accumulation de la quinacrine (même protocole que dans (B).

<u>1.2 Accumulation autophagique chez les fibroblastes dermiques de souris traités</u> avec la quinacrine

La macroautophagie est activée chez les cellules traitées avec l'inhibiteur de mTor, la rapamycine (elle imite une privation métabolique (Codogno et Meiler, 2005)), pendant qu'une inhibition du flux autophagique est le mécanisme suspecté à la suite de la séquestration d'amines ou par des traitements avec la bafilomycine A1 (Marceau et coll., 2012). Ce mécanisme fut confirmé dans les fibroblastes dermigues de souris et démontré par l'accumulation de la forme activée et lipidée (II) de l'effecteur autophagique LC3 à la suite de traitement avec quinacrine à une concentration de 5 µM (Fig. 13 A). La spautin-1 est un inhibiteur du processus autophagique grâce à son action inhibitrice sur la Beclin-1 qui initie l'enveloppement membranaire des autophagosomes (Liu et coll., 2011 ; Shao et coll., 2014). Ce médicament inhiba significativement l'accumulation de la protéine LC3 II induite par un traitement d'une durée de 4 h avec la quinacrine ou avec la bafilomycine A1 (Fig. 13 A). Ces résultats indiquent un effet inhibiteur potentiel de l'accumulation autophagique. Cependant, la spautin-1 n'avait pas modifiée l'accumulation de la quinacrine dans les cellules (transport quantitatif de la quinacrine sur une période de 4 h, Fig. 13 B). Cette absence de modification suggère que l'accumulation autophagique est une réponse en aval du transport du médicament cationique lysosomotropique


FIGURE 13 : Effet de l'inhibiteur autophagique, spautin-1, sur le transport de la quinacrine dans les fibroblastes dermiques de souris.

(A) Confirmation de l'effet inhibiteur de la spautin-1 de l'accumulation de la protéine LC3 II dans les cellules traitées pour une durée de 4 h. La densitométrie moyenne des immunobuvardages est représentée par les histogrammes des réplicas expérimentaux. La concentration de LC3 I n'a pas changé significativement (ANOVA). Les valeurs de LC3 II étaient hétérogènes (P < 0,001; test de Bonferroni de comparaison multiple pour les paires de données : * P < 0,05, ** P < 0,001 vs témoin ; † P < 0,05 vs les traitements sans spautin-1). (B) L'effet de la spautin-1 sur l'accumulation de la quinacrine sur une période de 4 h suffisante pour induire une accumulation autophagique (n = 5). La spautin-1 fut appliquée 30 minutes avant les autres agents pharmacologiques.

Les fibroblastes dermiques de souris C57BL/6 furent mis en culture pour une durée de 24 h en présence de quinacrine afin d'imiter une administration *in vivo*. L'accumulation de la protéine LC3 II était dépendante de la concentration et elle était statistiquement significative à une concentration de quinacrine de 2,5 μ M (Fig. 14 A). La présence de la rapamycine avait seulement un léger effet après une période de traitements de 24 h et il n'avait pas été additif avec celui de la quinacrine (2,5 μ M). La protéine p62/SQSTM1 joue un rôle essentiel dans la macroautophagie et est aussi un indicateur du flux autophagique (définie dans l'Introduction). Des traitements avec la quinacrine (≥2,5 μ M) ou la bafilomycine A1 induisaient une accumulation significative de la protéine p62/SQSTM1 comparativement au faible niveau basal chez les fibroblastes dermiques de souris témoins (Fig. 14 B).



FIGURE 14 : Caractérisation de l'autophagie induite par l'accumulation de la quinacrine dans les fibroblastes dermiques de souris comparativement à d'autres traitements. L'effet de la quinacrine et autres agents pharmacologiques, pour une durée de 24 h, sur l'accumulation de LC3 (A) et p62/SQSTM1 (B) dans des extraits cellulaires (immunobuvardages). Dans (A) et (B), la densitométrie moyenne est représentée par les histogrammes pour les réplicats expérimentaux (indiqué par *n*). Les valeurs de LC3 I (A) n'ont pas changé significativement entre les groupes, mais les valeurs de LC3 II (A) et p62/SQSTM1 (B) étaient hétérogènes (ANOVA : P < 10⁻⁴ et 0.001, respectivement). Comparaison avec le groupe témoin de chaque protéine : * P < 0,05; ** P < 0,01 (Test de Dunnett).

<u>1.3 La lysosomogénèse chez les fibroblastes dermiques de souris traités avec la</u> guinacrine

L'inhibition ou le tamponnage de l'acidification des organelles contenants la pompe V-ATPase peuvent causer une lysosomogénèse. Comme jugé par l'abondance de LAMP1 et LAMP2 dans les cellules, un traitement avec la quinacrine d'une durée de 48 h (\geq 1 ou 0,25 µM, respectivement) a augmenté de manière significative la masse des compartiments des endosomes/lysosomes tardifs où ces protéines sont trouvées (Fig. 15). Le sevrage de sérum, un stimulant du processus autophagique (Li, Chen et Gibson, 2013), et la rapamycine étaient moins actifs à cet égard (les effets n'étaient pas statistiquement significatifs). Seulement le sevrage de sérum des cellules induisait une augmentation de LAMP1, mais seulement en présence de traitements d'une durée de 24 h (non montré). Une RT-PCR était effectuée après une stimulation avec la quinacrine ou avec un sevrage de sérum d'une durée de 24 h. Elle démontrait que ces deux types de traitement augmentaient la présence des ARNm pour les protéines LAMP1 et LAMP2 dans les fibroblastes dermiques de souris (une différence significative observée à une concentration de 2,5 µM du médicament, mais non significative à une concentration de 250 nM) (Fig. 16 A).



FIGURE 15: Présence de lysosomogénèse démontrée par immunobuvardage dans les fibroblastes dermiques de souris à la suite de traitements avec la quinacrine. (Haut) L'effet prolongé (48 h) de la quinacrine et autres traitements sur la lysosomogénèse des fibroblastes dermiques de souris démontrée par des immunobuvardages des protéines LAMP 1 et LAMP 2. (Bas) La densitométrie moyenne des immunobuvardages des réplicats expérimentaux. Les valeurs de LAMP1 et LAMP2 variaient significativement pour chaque protéine (P < 0,05, test de Kruskal-Wallis). Comparaison entre les groupes contrôles de chaque protéine : * P < 0,05; ** P < 0,01 (test de comparaison multiple de Dunnett).



FIGURE 16 : Détermination par RT-PCR des niveaux d'ARNm des protéines LAMP1 et LAMP2 dans les fibroblastes dermiques de souris à la suite de traitements par la quinacrine ou par le sevrage de sérum pour une durée de 24 h.

(A) Le rapport LAMP/GAPDH fut normalisé à 1 pour chaque puit de cellule témoins des 5 séries de puits et les résultats sont exprimés en facteur d'augmentation vs les groupes contrôles. Le test Kruskal-Wallis démontrait que les valeurs des deux protéines, LAMP1 et LAMP2, étaient hétérogènes (P < 0,01 pour chaque ensemble).* P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001 vs témoin (Test de comparaison multiple de Dunnett pour chaque paires). (B, C) La translocation nucléaire du TFEB marqué avec la séquence myc à la suite de traitements avec la quinacrine dans les fibroblastes dermiques de souris (immunofluorescence des cellules fixées et perméabilisées). Des exemples des microphotographies sont présentés en (C). Les histogrammes représentent la proportion de cellules avec un marquage nucléaire significatif, indiquant une translocation nucléaire du TFEB. Statistiques χ^2 : * P < 0,01; ** P < 0,001 vs les cellules contrôles.

Le facteur de transcription EB (TFEB) contrôle l'expression des protéines LAMP1, LAMP2, les sous-unités de la pompe V-ATPase et l'expression de plusieurs autres gènes codants pour des protéines présentes dans les lysosomes (Sardiello et coll., 2009 ; Peña-Lopis et coll., 2011). Les fibroblastes dermiques de souris qui exprimaient le facteur de transcription EB marqué avec un épitope « *myc* » étaient soumis à une immunofluorescence avec l'utilisation de l'anticorps « *anti-myc* » (Fig. 16 B et 16 C). Les cellules au repos démontraient une localisation cytosolique du TFEB comparativement aux cellules traitées avec la quinacrine pour une durée de 24 h, où la localisation était plutôt nucléaire (proportions statistiquement différentes aux concentrations 0,25 et 2,5 µM, Fig. 16 B et 16 C).

Les fibroblastes dermiques de souris furent utilisés afin d'étudier si des traitements de 24 et 48 h de quinacrine augmentent l'activité d'une hydrolase lysosomale, la cathepsine D (Fig. 17). Les traitements de quinacrine et de sevrage de sérum n'ont pas modifié l'activité enzymatique comparativement au groupe contrôle.



FIGURE 17 : Activité enzymatique de la cathepsine D dans les fibroblastes dermiques de souris.

Les fibroblastes dermiques de souris furent traités pendant 24 et 48 h avec la quinacrine ou le sevrage de sérum. L'ANOVA démontra qu'aucune différence significative n'était présente dans l'activité enzymatique entre chaque traitement.

1.4 La distribution tissulaire de la quinacrine chez la souris

L'administration de la quinacrine pour une durée de 48 h n'avait aucun effet observable sur les souris vivantes (comportement, poids). Dans les poumons disséqués des souris traitées avec la quinacrine (40 mg/kg/jour), la fluorescence verte du médicament était observée suivant un motif de points granulaires (Fig. 18 A ; l'autofluorescence était négligeable dans des organes de souris traitées avec la saline). Des tranches de poumons de souris non traitées furent incubées pendant 30 minutes à 37°C et pouvaient accumuler la quinacrine *in vitro* (1 μ M dans HBSS) sous la forme de points lumineux discrets et dispersés dans la structure alvéolaire (Fig. 18 B). Un cotraitement avec la bafilomycine A1 réduisit fortement cette concentration qui concerne probablement des macrophages alvéolaires. Une étude basée sur la microscopie des cellules obtenues après un lavage broncho-alvéolaire confirme leur capacité à concentrer la quinacrine (0,1 ou 1 μ M, 4 h) avec une haute affinité (Fig. 18 C).

A. Traitements In vivo, stéréo-microscopie en fluorescence, coupes de



B. Traitements *ex vivo*, stéréo-microscopie en fluorescence, coupes de poumons (80x) + bafilomycine A1 100 nM



C. Macrophages broncho-alvéolaires de souris (600x)



FIGURE 18 : Tropisme de la quinacrine pour les poumons de souris.

(A) Des tranches fraîches de poumons de souris traitées *in vivo* avec la quinacrine (40 mg/kg/jour) pour 48 h observées en fluorescence avec la microscopie à dissection (magnification 80x ou *high power*, HP). Les organes des souris traitées avec la saline démontrent le niveau d'autofluorescence. (B) Le marquage *ex vivo* de tranches fraîches de poumons avec la quinacrine, avec cotraitements optionnels de bafilomycine A1. Les coupes furent incubées dans du *Hank's balanced salt solution* à 37°C et ensuite traitées avec les médicaments pour une durée de 30 minutes (grossissement 80x). (C) Marquage *ex vivo* de macrophages broncho-alvéolaires de souris avec la quinacrine, avec cotraitements optionnels de bafilomycine, avec la quinacrine, avec la souris avec la quinacrine, avec la souris avec la quinacrine, avec souris avec la quinacrine, avec souris avec la quinacrine, avec cotraitements optionnels de bafilomycine A1. Les cellules furent ensemencées 1 h avant les traitements de 4 h (grossissement 600x).

Une méthode quantitative basée sur la fluorométrie était appliquée afin de mesurer l'accumulation de la quinacrine dans des explants d'organes provenant de différents groupes de souris traitées in vivo. Le foie et la rate démontraient une grande quantité du médicament, comparativement au cerveau qui n'en contenait presque pas, et la quantité de quinacrine dans les autres organes était intermédiaire (Fig. 19). Les poumons de souris furent choisis afin d'étudier en profondeur la signalisation induite par la quinacrine in vivo. Ces organes sont situés dans une zone extra-abdominale et ils sont isolés du site d'injection péritonéal du médicament. Les poumons des souris traitées avec la quinacrine pour une période de 2 jours (40 ou 80 mg/kg/jour) ou avec le véhicule (saline) furent homogénéisés et les extraits furent soumis à des immunobuvardages. Dans ces poumons, une accumulation dépendante de la dose fut observée pour la protéine p62/SQSTM1 (significative à 80 mg/kg/jour ; Fig. 20). Une inhibition du flux autophagique était donc observée après 24 h de la dernière administration. La glycoprotéine lysosomale LAMP2 était peu augmentée, mais la différence était statistiquement significative dans les poumons des souris traitées avec les deux niveaux de dose.





L'autofluorescence est quantifiée à l'aide des extraits des souris traitées avec la saline et fut comparée avec la fluorescence des extraits d'organes des souris traitées avec la quinacrine avec le test de Student (* P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001).





FIGURE 20 : Réponses *in vivo* aux traitements avec la quinacrine des marqueurs de l'autophagie et de la lysosomogénèse démontrées par immunobuvardages des extraits de poumons de souris.

(A) Des groupes de 4 souris furent traitées 2x à des intervalles de 24 h et euthanasiées 24 h après la dernière injection. La numérotation 1-4 de chaque groupe expérimental représente les extraits de chaque animal expérimental. (B) Les quantités moyennes des protéines p62/SQSTM1 et LAMP2 étaient hétérogènes entre les groupes (ANOVA : P < 0,01 et 0,05, respectivement). Comparaison avec les valeurs du groupe contrôle de chaque protéine : * P < 0,05; ** < 0,01 (test de Dunnett).

1.5 Expériences supplémentaires avec les cellules HEK 293a

Les cellules HEK 293a furent utilisées afin de confirmer quelques aspects démontrés chez les fibroblastes dermiques de souris. Les cellules HEK 293a furent incubées avec la quinacrine (1 µM ou 2.5 µM) pour une durée de 4 h avec la bafilomycine A1 (100 nM) ou avec le véhicule (DMSO) afin d'étudier sa distribution subcellulaire. Comme chez les fibroblastes dermiques de souris, une fluorescence intense est observée dans les granules périnucléaires. Un faible marquage nucléaire est observé aux concentrations plus fortes sans aucun dommage cellulaire observé (Fig. 21). Les cellules ayant reçu un cotraitement avec l'inhibiteur de la pompe V-ATPase ; la bafilomycine A1, ne démontraient aucune fluorescence granulaire, mais une fluorescence nucléaire était observée. Ce marquage nucléaire est consistant avec l'affinité de la quinacrine pour l'ADN.



HEK 293a cells



Démonstration morphologique de la fluorescence à la suite de l'absorption de la quinacrine dans les vacuoles périnucléaires et/ou nucléaire avec l'effet de cotraitements avec la bafilomycine A1sur sa distribution subcellulaire chez les cellules HEK 293a.

Le transport de la quinacrine fut analysé chez les cellules HEK 293a après une période d'incubation de 30 minutes. La fluorescence fut mesurée dans des extraits cellulaires totaux et modélisée comme une courbe hyperbolique avec les paramètres : $V_{max} = 14,1 \pm 2,3$ nmol/puits/30minutes et K_m = 14,1 ± 2,5 µM (Fig. 22). Chez les cellules cotraitées avec la bafilomycine A1 (100 nM), l'ampleur de l'absorption de la quinacrine était significativement, mais pas complètement, abolie ($V_{max} = 2,3 \pm 0,5$ nmol/puits/30minutes). L'absorption de la quinacrine résiduelle chez ces cellules peut être expliquée par une coloration nucléaire comme démontrée par les expériences de microscopie (Fig. 21).



FIGURE 22 : Transport de la quinacrine chez les cellules HEK 293a. Absorption de la quinacrine dans les cellules HEK 293a mesurée par la fluorescence associée aux extraits cellulaires. L'effet de cotraitements optionnels avec la bafilomycine A1 sur le transport de la quinacrine après traitements de 30 minutes.

Les OCT-1 à 3 humains fusionnés avec le marqueur myc furent codés dans des vecteurs transfectés dans les cellules HEK 293a (Fig. 23). L'immunobuvardage des extraits protéiques de ces cellules transfectées révèle des bandes protéiques doubles (55 et 85 kDa) pour chacunes des constructions comme indiqué par le fabricant des vecteurs (Fig. 23 A). L'expression des transgènes à différents niveaux, y compris la membrane plasmique, est mise en évidence par l'immunofluorescence des cellules transfectées (l'anticorps monoclonal anti-myc, clone 4A6, couplé avec AlexaFluor-488 (Millipore), fig. 23 B). De plus, l'absorption d'une concentration

relativement faible (100 nM) de [³H] MPP⁺, un substrat des OCT-1 à 3 (Nies et coll., 2011), était significativement plus élevée chez les cellules HEK 293a transfectées comparativement aux cellules transfectées avec le vecteur vide pcDNA 3.1 (Fig. 23 C). L'inhibiteur des OCTs, le décynium-22, avait légèrement diminué le transport de la quinacrine chez les cellules HEK 293a (Fig. 24). Cependant, les cellules transfectées avec le vecteur pas de variation significative entre le transport de la quinacrine (gamme de concentration micromolaire ; Fig. 24 B) : les valeurs de V_{max} et K_m étaient similaires à celles des cellules transfectées avec le vecteur vide.



FIGURE 23 : Validation de l'expression transitoire des OCTs fusionnés avec myc dans les cellules HEK 293a.

(A) Immunobuvardage du marqueur myc des constructions dans des extraits protéiques de cellules HEK 293a transfectées (n = 2). (B) Immunofluorescence de cellules HEK 293a fixées et perméabilisées qui expriment les OCTs. (C) Absorption du [³H]MPP + (100 nM) influencée par l'expression des OCTs. Les résultats sont exprimés sous forme de l'amplitude des valeurs observées chez les cellules transfectées avec le vecteur vide (valeur moyenne absolue 283 ± 53 fmol/puits). Les valeurs étaient significativement hétérogènes (ANOVA, p < 0,01). * P < 0,01 vs les cellules transfectées avec le vecteur vide.



FIGURE 24 : Transport de la quinacrine dans les cellules HEK 293a.

(A) L'effet de l'inhibiteur des OCTs, le décynium-22, sur le transport de la quinacrine dans des extraits totaux de cellules HEK 293a. (B) L'effet de la surexpression des OCTs fusionnés avec le marqueur myc sur le transport de la quinacrine dans les cellules HEK 293a transfectées (exprimé en valeurs absolues ou en pourcentage du transport maximal enregistré à 30 μ M; aucune différence significative ne fut observée.

2. L'effet cytostatique et cytotoxique des médicaments cationiques lysosomotropiques : rôle de la liposolubilité et du flux autophagique et effet de l'ablation du cholestérol

2.1 Modèles cellulaires

Quatre modèles cellulaires humains furent testés pour l'effet antiprolifératif d'une série de 6 amines tertiaires. Les cellules non adhérentes leucémiques monocytaires humaines, U937, n'exprimaient pas la protéine p53 (Fig. 25). Cette absence est consistante avec les délétions des deux copies du gène codant pour cette protéine dans leur génome (Shiohara et coll., 1994). Ces cellules exprimaient la plus grande quantité de LAMP1, indiquant une grande quantité de compartiments lysosomaux/endosomaux tardifs. Les lignées d'un mélanome humain, M21, les HEK 293a et les cellules endothéliales HUVEC furent aussi soumises à l'immunobuvardage. Ces trois dernières lignées cellulaires démontraient un niveau basal variable de p62/SQSTM1, LC3, p53 et LAMP1 (Fig. 25). Le niveau basal des marqueurs autophagiques LC3 II et p62/SQSTM1 était particulièrement élevé chez les cellules M21.



FIGURE 25 : Expression de protéines spécifiques chez 4 lignées cellulaires sans traitements.

La morphologie des cellules est démontrée après leur détachement avec la trypsine (sauf chez les cellules U937 non adhérentes).

2.2 L'effet des s-Et3N sur la prolifération cellulaire

Un essai de prolifération cellulaire utilisé précédemment fut appliqué à notre modèle cellulaire ; 50,000 cellules furent ensemencées dans des pétris au temps zéro ; les médicaments cationiques furent introduits au temps 24 heures et les cellules furent détachées (sauf les cellules non adhérentes, U937), et comptées au temps 72 heures (Fig. 26). Dans les conditions témoins, tous les 4 types de cellules étaient prolifératifs (nombre moyen du décompte cellulaire est donné dans la légende de la Fig. 26). Cependant, tous les 6 médicaments cationiques ont diminué profondément leur prolifération d'une manière dépendante de la concentration avec un ordre de puissance qui était semblable d'un type de cellule à l'autre. La quinacrine était l'inhibiteur de la prolifération le plus puissant, suivi de l'amiodarone, de la chloroquine = l'hydroxychloroquine, de la lidocaïne et de la procainamide (Fig., 22). La puissance de l'activité antiproliférative de chaque médicament était variable pour lignée cellulaire, plus remarguablement pour l'amiodarone et chaque Les valeurs enregistrées des Cl₅₀ pour chacun des l'hydroxychloroquine. médicaments cationiques lysosomotropiques sont réparties sur une grande gamme de concentration, d'environ 1 µM pour la quinacrine jusqu'à 3 mM pour la procainamide. Ces valeurs sont globalement inversement corrélées avec leur lipophilicité, exprimée en logP (Fig. 27). Les cellules qui prolifèrent les plus rapidement, U937, étaient souvent présentes en grand nombre après la période d'incubation, possiblement due à la leur prolifération lors du premier 24 h, pendant que les autres lignées cellulaires doivent adhérer. Des cellules U937 résistantes à la guinacrine (5-10 µM) ou la chloroguine (25-50 µM) ne pouvaient pas être sélectionnées après une période de traitements d'une durée de 5 semaines.



FIGURE 26 : Effet des médicaments triéthylamines substitués (s-Et₃N) sur la prolifération de 4 lignées cellulaires.

50,000 cellules furent ensemencées 72 h avant le décompte cellulaire. Chaque traitement fut ajouté 48 h avant le décompte. Le décompte cellulaire est normalisé comme un pourcentage des valeurs du groupe contrôle pour chaque journée expérimentale. Les valeurs absolues de chaque décompte des contrôles à 72 h étaient 946,592 \pm 51,976 (n = 38) pour les cellules U937, 484,597 \pm 24,501 (n = 36) pour les cellules M21, 308,315 \pm 9,089 (n = 36) pour HUVECs et 528,015 \pm 22,496 (n = 34) pour les cellules HEK 293a.



FIGURE 27 : Corrélation entre les valeurs antiprolifératives Cl₅₀ des 6 s-Et₃N de la série chez les 4 lignées cellulaires et leur lipophilicité, exprimée en logP. Les valeurs du logP sont obtenues sur le site web <u>http://chembank.broadinstitute.org/</u>. Les structures de chaque médicament sont démontrées en bas de la figure.

La proportion des cellules dans leurs différentes phases du cycle cellulaire fut testée chez les cellules U937 (p53-négatives) et chez les cellules primaires HUVECs à la suite de traitements d'une durée de 48 h avec 3 médicaments s-Et₃N. Ces derniers représentent toute l'échelle de la lipophilicité (évaluation de la coloration du

margueur d'ADN Hoechst 33342 par cytofluorométrie, Figs. 28, 29 respectivement). Aucun effet consistant ne fut observé à la suite de traitements à des concentrations cytostatiques des médicaments cationiques ; quelques changements peuvent être reliés à l'effet cytotoxique de médicaments individuels. Ces derniers étaient démontrés par une distribution élevée de la phase sub-G1 (particulièrement pour la procainamide 5 µM chez les cellules U937). Une détermination simultanée de la fluorescence verte de la guinacrine, dans les mêmes lignées cellulaires, met en évidence son accumulation qui est dépendante de sa concentration. La quinacrine était le seul médicament s-Et₃N intrinsèquement fluorescent (Figs. 28, 29). Afin de vérifier un arrêt dans les phases G₀G₁ du cycle cellulaire à la suite de traitements par les s-Et₃N chez les cellules, l'expression et la phosphorylation de la protéine pRB furent testées avec les mêmes échantillons cellulaires (traitements avec les s-Et₃N pour une période de 48 h chez les cellules U937 et les HUVECs, Figs 30 et 31 respectivement). Les médicaments cationiques n'ont augmenté pas significativement la déphosphorylation du pRB chez les HUVECs qui est prédictive d'un tel arrêt.



FIGURE 28 : Analyse du cycle cellulaire basée sur la détermination par cytofluorométrie du Hoechst 33342 dans les cellules U937 traitées avec les s-Et₃N pour une durée de 48 h. En haut à gauche, on représente les histogrammes qui démontrent la proportion des cellules dans chaque phase du cycle cellulaire. Des échantillons des enregistrements des expériences cytofluorométriques correspondantes aux conditions expérimentales indiquées par des lettres minuscules sont démontrés en bas de la figure. En haut à droite, on représente la fluorescence verte enregistrée simultanément dans les cellules.



FIGURE 29 : Analyse du cycle cellulaire basée sur la détermination par cytofluorométrie du Hoechst 33342 dans les HUVECs traitées avec les s-Et₃N pour une durée de 48 h. En haut à gauche, on représente les histogrammes qui démontrent la proportion des cellules dans chaque phase du cycle cellulaire. Des échantillons des enregistrements des expériences cytofluorométriques correspondantes aux conditions expérimentales indiquées par des lettres minuscules sont démontrés en bas de la figure. En haut à droite, on représente la fluorescence verte enregistrée simultanément dans les cellules.



phospho-pRB (Ser^{807/811})



FIGURE 30 : Démonstration du niveau de phosphorylation du pRB chez les cellules U937 traitées pour une durée de 48 h avec des médicaments s- Et_3N sélectionnés. Résultats représentatifs de 2 expériences.



phospho-pRB (Ser807/811)



FIGURE 31 : Démonstration du niveau de phosphorylation du pRB chez les HUVEC traitées pour une durée de 48 h avec des médicaments s-Et₃N sélectionnés. Résultats représentatifs de 2 expériences.

2.3 Transport des médicaments cationiques et l'autophagie chez les cellules U937

traitées aux s-Et3N

Le seul médicament cationique de la série des s-Et₃N qui possède suffisamment de fluorescence intrinsèque pour une détermination par cytofluorométrie dans les cellules U937 est la quinacrine (Fig. 32). Il fut démontré que l'accumulation de la quinacrine dans les cellules U937 était rapide (significative à l'intérieur de 60 minutes) et dépendante de l'acidification des compartiments vacuolaires par la pompe V-ATPase : les cotraitements de bafilomycine A1 ont abrogé la séquestration aiguë de la quinacrine dans ces cellules (cytofluorométrie et microscopie Fig. 32 A, B).

Les cellules vacuolaires qui capturent et retiennent diverses amines présentent une inhibition de leur flux autophagique (voir introduction). Une de deux lignées cellulaires dérivées de cas cliniques en oncologie, les cellules U937, fut examinée pour son accumulation autophagique après une période de traitements de 6 h avec l'aide du marqueur autophagique LC3 II (Fig. 33). Le puissant inhibiteur de la résolution autophagique, bafilomycine A1, fut aussi utilisé lors de ces expériences. Une augmentation importante dans les extraits protéigues des cellules U937 de l'effecteur autophagique LC3 II à la suite des traitements avec les 6 s-Et₃N fut observée d'une manière dépendante de leur concentration (avec l'exception de l'amiodarone à 25 µM, une concentration cytotoxique). Les valeurs de concentration qui produisent un seuil d'accumulation de LC3 II (intensité arbitraire de 50) à la suite de traitements de courtes durées (temps d'incubation de 6 h) prédisent fortement la concentration de médicaments nécessaire pour réduire de 50% la prolifération des cellules U937 (Fig. 34 A, corrélation avec les valeurs de log (concentration) : r = 0,94, p < 0.01). L'analyse présentée dans la figure 34 B démontre, chez chaque médicament cationique lysosomotropique de la série, que l'accumulation du marqueur autophagique LC3 II (à la suite de traitements de 6 h) est inversement corrélée avec le décompte cellulaire final des cellules U937, d'une manière indépendante de la concentration des s-Et₃N.



FIGURE 32 : Mécanisme de la séquestration de la quinacrine chez les cellules U937. (A) L'effet de la concentration de la quinacrine et des cotraitements optionnels avec la bafilomycine A1 (quantification par cytofluorométrie de la fluorescence verte). Des exemples de la distribution de la fluorescence sont démontrés à l'intérieur de la figure. (B) Démonstration morphologique de la capture de la quinacrine et abolition par cotraitements de la bafilomycine A1. Magnification 400x avec une microphotographie en épifluorescence (droite) et en transmission (gauche) des champs sélectionnés.







Les cellules furent traitées pour une durée de 6 h avec les médicaments. Les immunobuvardages représentatifs sont démontrés en haut de la figure. Ils présentent une diminution de LC3 I et une accumulation de LC3 II d'une manière dépendante de la concentration. Un chargement égal dans chacun des puits fut confirmé par un immunobuvardage pour la protéine β -actine. Les valeurs densitométriques de LC3 II sont montrées en bas de la figure (n = 3-4).





(A) Corrélation entre l'activité antiproliférativedes médicaments s-Et₃N lors des essais de prolifération (traitements de 48 h, Fig. 22) et l'accumulation de LC3 II (traitements de 6 h Fig. 29) dans les cellules U937. (B) Corrélation entre la protéine LC3 II et le décompte cellulaire pour chaque médicament individuel. Les intensités de LC3 II ayant une valeur supérieure à 100 furent exclues de même que les valeurs des cellules traitées avec des concentrations cytotoxiques d'amiodarone (25 μ M).

2.4 Réponses tardives à la suite de traitements aux s-Et3N chez les cellules U937

Les cellules U937 furent soumises à des analyses supplémentaires afin de caractériser des réponses tardives à la suite de traitements avec les médicaments cationiques lysosomotropiques. Ces tests furent appliqués à une grande quantité de cellules U937 traitées pour une période de 24 - 48 h avec des s-Et₃N à des concentrations qui inhibent la prolifération cellulaire d'un facteur d'un ou deux tiers. Ces concentrations furent utilisées afin de dépister un phénotype typique qui pourrait prédire une utilité anti-tumorale.

Plus de 90% des cellules U937 n'étaient pas colorées par le marqueur d'ADN, imperméable aux membranes, DRAQ7 dans les tests de viabilité par analyse fluorométrique (Fig. 35). Les traitements avec l'actinomycine D (400 nM) ont réduit la viabilité cellulaire de 66% après une période de 24 h et environ ~80% après une période de 48 h. En revanche, les s-Et₃N étaient étonnamment bien tolérés par les cellules avec des concentrations cytostatiques, mais pas cytotoxiques (quinacrine 1-5 μ M, amiodarone 5-10 μ M, chloroquine et hydroxychloroquine 50 μ M, lidocaïne et la procainamide 2,5 mM). La viabilité des cellules U937 avait diminué significativement lorsqu'elles furent traitées avec l'amiodarone 25 μ M, la chloroquine et l'hydroxychloroquine 100 μ M et la lidocaïne et la procainamide 5 mM.





FIGURE 35 : Viabilité des cellules U937 estimée par détermination cytofluorométrique de capture de DRAQ7.

Les cellules furent traitées pendant 24 ou 48 h avec le médicament indiqué. Les résultats sont exprimés en proportion des cellules excluant le marqueur d'ADN. L'ANOVA indiquait que les ensembles des valeurs étaient hétérogènes (traitements de 24 h : $P < 10^{-4}$; traitements de 48 h : $P < 10^{-4}$). L'effet individuel de chaque traitement était analysé avec le test de Dunnett (* P < 0.05; ** P < 0.01 vs les valeurs des groupes témoins). Des exemples de fluorescence sont démontrés en bas de la figure (traitements de 24 h). Une détection du processus apoptotique à la suite de traitements avec les médicaments cationiques lysosomotropiques était basée sur le niveau de clivage de PARP1 ; une réaction tardive médiée par la caspase-3 (Nicholson et coll., 1995). Chez la plupart des cellules des groupes contrôles, il y avait une petite proportion de clivage de PARP1 (Fig. 36). Des traitements avec les s-Et₃N pour une durée de 24 h n'augmentaient généralement pas le niveau de clivage des cellules, sauf avec les traitements avec l'amiodarone (25 μ M) et la lidocaïne (5 mM) (Fig. 36). Des traitements avec l'actinomycine D furent utilisés comme témoins positifs : le clivage de PARP1 était presque complet dans les cellules U937 suite à ce traitement.





treatment (µM)

FIGURE 36 : Clivage de PARP1 à la suite de traitements de 24 h avec les médicaments s-Et₃N chez les cellules U937.

(A) Exemples des immunobuvardages pour la protéine PARP1. (B) Le taux de clivage de PARP1 représenté par densitométrie des réplicats expérimentaux. L'ANOVA démontrait que les valeurs étaient hétérogènes (P < 10^{-4}). L'effet individuel de chaque traitement fut analysé avec le test de Dunnett (* P < 0.01 vs les valeurs du groupe témoin).
2.5 Réversibilité de l'effet antiprolifératif des amines par des agents qui interfèrent avec le réseau de signalisation du mévalonate conduisant à la synthèse du cholestérol et à la prénylation des protéines

Les cotraitements avec la β -cyclodextrine réduisent l'effet antiprolifératif de l'amine primaire, la leelamine (Kuzu et coll., 2014). Dans les expériences rapportées dans la Figure 37, l'essai de prolifération des cellules U937 était légèrement modifié comparativement aux autres essais mentionnés antérieurement : Brièvement, 50,000 cellules furent ensemencées dans des pétris au temps zéro avec les médicaments s-Et₃N et avec ou sans cotraitement avec la β -cyclodextrine (1 mM). Les cellules U937 furent ensuite soumises à un décompte cellulaire après une période d'incubation de 48 h. Lors de ces essais, la β -cyclodextrine ajoutée en absence de s-Et₃N n'a pas modifié la prolifération rapide des cellules (~8 fois) et n'a pas empêché la perte complète des cellules induite par l'actinomycine D (400 nM, un témoin positif de cytotoxicité). Cependant, les cotraitements avec la β cyclodextrine ont partiellement renversé l'effet antiprolifératif des 6 triéthylamines substituées (généralement lorsque le décompte cellulaire était sous la zone pointillée, Fig. 37).



treatment (µM)

FIGURE 37 : Renversement partiel de l'effet antiprolifératif des s-Et₃N par des cotraitements avec la β -cyclodextrine (1 mM) chez les cellules U937 50,000 cellules furent ensemencées avec les traitements 48 h avant chaque décompte cellulaire. L'actinomycine D était choisi comme témoin positif. Les valeurs sont les moyennes ± l'erreur-type d'au moins 4 déterminations. L'effet des cotraitements avec la β -cyclodextrine à chaque concentration de chaque médicament s-Et₃N : * P < 0,05 ; ** P < 0,001 (test de Student).

Les statines inhibent la synthèse du cholestérol au niveau de la 3-hydroxy-3méthylglutarul-CoA réductase ; le produit de cette dernière étant l'acide mévalonique. Il fut démontré par Burke et Kykoly (2008) que des concentrations micromolaires de lovastatine inhibent la prolifération cellulaire des U937. Lors de nos essais de prolifération de 48 h, une concentration plus faible fut utilisée (100 nM), qui était légèrement, mais significative antiproliférative (Fig. 38). Les cotraitements avec la lovastatine ont partiellement, mais significativement renversé l'effet antiprolifératif de tous les médicaments cationiques lysosomotropiques de la série à toutes les concentrations testées, mais pas celle de l'actinomycine D. La



prolifération maximale avec des cotraitements de lovastatine était équivalente au niveau observé chez les cellules traitées avec seulement la statine (Fig. 38).

treatment (µM)

FIGURE 38 : Renversement partiel de l'effet antiprolifératif des s-Et₃N par des cotraitements avec la lovastatine (100 nM) chez les cellules U937. 50,000 cellules furent ensemencées avec les traitements 48 h avant chaque décompte cellulaire. L'actinomycine D était choisi comme contrôle positif. Les valeurs sont les moyennes ± l'erreur-type d'au moins 4 déterminations. L'effet des cotraitements avec la lovastatine à chaque concentration de chaque médicament s-Et₃N : * P < 0,05 ; ** P < 0,01 ; *** P < 0.001 (test de Student).

Certains effets des statines sur les cellules se rapportent à l'inhibition de la prénylation des protéines médiées par un métabolite en aval du mévalonate : le géranylgéranyl pyrophosphate (GGPP). Il a été précédemment démontré qu'un ajout de GGPP (10 μ M) dans le milieu de culture augmente le contenu intracellulaire d'isoprénoïdes (Mohamed et coll., 2012). Cependant, des cotraitements de GGPP n'avaient aucun effet significatif sur l'effet antiprolifératif des composés s-Et₃N (Fig. 39).



treatment (µM)

FIGURE 39 : Absence du renversement de l'effet antiprolifératif des médicaments s-Et₃N par le géranylgéranyl-pyrophosphate (GGPP) chez les cellules U937. Présentation identique aux Figures 33 et 34.



FIGURE 40 : Détermination par cytofluorométrie du transport de la quinacrine avec des cotraitements optionnels de β -cyclodextrine ou lovastatine. L'effet de cotraitements d'une durée de 48 h avec la β -cyclodextrine (1 mM) ou lovastatine (100 nM) sur le transport de la quinacrine (1 μ M) chez les cellules U937. Aucune différence statistiquement significative n'était observée entre les groupes avec ou sans cotraitements.

L'effet de ces cotraitements fut observé après un traitement avec la quinacrine, à faible concentration (1 μ M), afin d'exclure que le gain de la fonction proliférative des cellules U937 à la suite de traitements avec la β -cyclodextrine (1 mM) ou lovastatine (100 nM) résulte de la liaison des s-Et₃N à l'oligosacharides ou d'une autre inhibition non spécifique (Fig. 40). Cette concentration de quinacrine fut choisie car elle avait un effet minimal sur la prolifération cellulaire. Après le traitement avec la quinacrine et les cotraitements (β -cyclodextrine, lovastatine ou véhicule), les cellules U937 furent soumises à une analyse cytofluorométrique à l'aide du *BD SORP LSR II cell analyser, BD Biosciences* (Franklin Lakes, NJ ; réglage de fluorescence FITC). Aucun effet significatif fut observé à la suite de cotraitements avec la β -cyclodextrine, ou lovastatine. Ces traitements moléculaires ont aussi failli à modifier significativement l'accumulation de la protéine autophagique LC3 II à la suite de traitements avec des s-Et₃N à des concentrations cytostatiques (Fig. 41). Les cotraitements étaient d'une durée de 48 h.



FIGURE 41 : Effet de cotraitements avec la β -cyclodextrine ou lovastatine sur l'accumulation de LC3.

L'effet de cotraitements d'une durée de 48 h avec la β -cyclodextrine (1 μ M) ou lovastatine (100 nM) sur l'accumulation de la protéine autophagique LC3 à la suite de traitements avec des concentrations cytostatiques de s-Et₃N chez les cellules U937. *AD* signifie l'actinomycine-D (400 nM) et *ctl* signifie le contrôle. Aucun effet significatif sur LC3 II était observé à la suite des cotraitements.

Dans les cellules U937 traitées pour une durée de 48 h avec la β -cyclodextrine ou la lovastatine, les niveaux de cholestérol total et libre n'ont pas été modifiés par rapport à ceux dans les cellules des groupes contrôles (Fig. 42 A). Cependant, l'hydroxychloroquine, l'un des deux médicaments s-Et₃N testés à une concentration cytostatique (50 μ M), augmenta le niveau de cholestérol total et libre sur une période de 48 h ; la procainamide (2,5 mM) était inactive à cet égard (Fig. 42 B).





(A) Absence d'effet de la β -cyclodextrine et la lovastatine. Les valeurs sont homogènes entre traitements (ANOVA). (B) L'effet de deux médicaments s-Et₃N à leur concentration cytostatique. Les valeurs du cholestérol libre ou total n'étaient pas homogènes (ANOVA, P < 0,05). * Valeurs significativement différentes des contrôles (test de Dunnett).

Une forme de trafic vacuolaire fut évaluée par l'accumulation endosomale de la transferrine marquée avec l'AlexaFluor-594 (Fig. 43). À des concentrations antiprolifératives, les médicaments s-Et₃N ont généralement déprimé l'absorption de la transferrine avec l'exception notable de l'amiodarone. Celle-ci l'augmente un peu à 5-10 μ M, mais la diminue à 25 μ M. Parallèlement à la détermination cytofluorométrique des cellules associées à la transferrine (marqué avec l'AlexaFluor-594), il était possible de mesurer l'absorption de la quinacrine d'une manière dépendante à sa concentration (Fig. 43, en haut à gauche). Les traitements avec la β -cyclodextrine n'ont pas modifié les effets des s-Et₃N sur la capture de la transferrine ou la quinacrine.



FIGURE 43 : Accumulation de la transferrine marquée avec l'AlexaFluor-594 chez les cellules U937 traitées avec les médicaments s-Et₃N avec des cotraitements optionnels de la β -cyclodextrine (1 mM) pour 24 h (détermination cytofluorométrique avec la fluorescence rouge).

La détermination simultanée de l'accumulation de la quinacrine était possible grâce à sa fluorescence verte (en haut à gauche). Les résultats sont les moyennes de l'intensité de la fluorescence ± l'erreur-type. Certaines distributions des cellules sont illustrées pour les cellules traitées avec la quinacrine.

DISCUSSION

1. Les médicaments cationiques lysosomotropiques et la bafilomycine A1

Une famille de 6 agents pharmaceutiques s-Et₃N fut choisie afin d'étudier les effets cytostatiques et cytotoxiques de chacun. De plus, la distribution subcellulaire et tissulaire de la quinacrine furent étudiées dans un modèle murin. Cette série de médicaments consiste en une liste arbitraire d'agents pharmaceutiques concernant leur utilisation clinique (voir Introduction). Ils sont tous des bases faibles (pKa \geq 8) et ils couvrent l'échelle de la lipophilicité. Tous ces médicaments cationiques lysosomotropiques sont généralement concentrés dans les régions acides vacuolaires des cellules à l'aide d'un mécanisme médié par la pompe V-ATPase. Ainsi, la solubilité élevée, caractéristique des lipides, facilite la diffusion des molécules vers les compartiments acides vacuolaires. Ces dernières seront protonées, séquestrées et concentrées (Fig. 44). La guinacrine, un des agents pharmaceutiques de la liste des 6 s-Et₃N, a deux fonctions protonables (pKa 1,3 et 7,7) et a une lipophilie élevée (logP 5,67). De plus, sa faible toxicité (non-mutagène malgré sa capacité à se lier à l'ADN à des concentrations élevées), son métabolite principal (une amine secondaire) qui conserve son tropisme pour les régions acides des cellules, sa lipophilie élevée et sa fluorescence verte intrinsèque sont tous des considérations pertinentes qui privilégient cette molécule-modèle (représentation schématique, Fig. 45).

Un fait remarquable observé est que les 6 s-Et₃N partagent des effets cellulaires semblables (l'inhibition du flux autophagique démontré par l'accumulation de la protéine autophagique LC3 II ; Fig. 13 et 33, et un effet antiprolifératif ; Fig. 26). L'effet antiprolifératif des s-Et₃N avait des intensités corrélées avec leur lipophilicité (Fig. 27). L'amiodarone, le médicament le plus lipophile de la série, était régulièrement le deuxième agent le plus puissant dans les divers essais, possiblement en raison de sa répartition dans tous les lipides cellulaires. Cette répartition s'explique par sa séquestration non granulaire résistante à la bafilomycine A1. La séquestration de l'amiodarone résistante aux traitements avec la

bafilomycine A1 fut démontrée grâce à sa faible fluorescence violette diffuse, mais ce n'est pas le cas avec la quinacrine (Marceau et coll., 2012 ; 2014).

La bafilomycine A1, l'inhibiteur spécifique de toutes les isoformes de la pompe V-ATPase des mammifères, a réduit d'un facteur > mille la concentration de la quinacrine dans les fibroblastes dermiques de souris (Fig. 11 et 12) et elle a démontré un même pouvoir inhibiteur chez les cellules U937 (Fig. 32). De plus, l'ionophore H⁺ monensin a également empêché la séquestration de la quinacrine dans les fibroblastes dermiques des souris (Fig. 12 A). L'effet de cet ionophore permet de confirmer le modèle de la cytopathologie causée par la séquestration des amines via une approche expérimentale alternative. Il est possible que la lente réversibilité de l'accumulation de la quinacrine lors des lavages des cellules soit causée par sa liaison aux phospholipides vacuolaires (Fig. 11 A). Comparativement à la quinacrine, un autre médicament cationique lysosomotropique, la procainamide est rapidement libérée à la suite d'un lavage des cellules (Morissette, Lodge et Marceau, 2008).

Nos études de la colocalisation de la quinacrine chez les fibroblastes dermiques de souris récapitulent bien les études antérieures effectuées par notre laboratoire (Morissette, Lodge et Marceau, 2008 ; Marceau et coll., 2009 ; Bawolak, Morissette et Marceau, 2010). La plupart des vacuoles, qui ont été dilatées par l'accumulation de la quinacrine, contenaient des marqueurs d'endosomes/lysosomes tardifs : le Rab7 et le LAMP1 (Fig. 10). Une colocalisation avec le marqueur endosomal Rab5 était parfois observée surtout si la forme continuellement active de Rab5 était exprimée chez les cellules (Fig. 10). Ces résultats étaient compatibles avec l'expression connue de la pompe V-ATPase dans les diverses organelles dérivées du trans-Golgi de la cellule de mammifères.

2. Transporteurs membranaires

En théorie, les types cellulaires individuels peuvent posséder des mécanismes de captation ou d'extrusion qui modulent l'accès à la quinacrine (Fig. 44). Le rôle de la glycoprotéine-P et des OCT-1 à 3 ont été étudiés à l'aide de notre modèle murin (utilisation des inhibiteurs de transporteurs membranaires, transfection de vecteurs codant pour les OCTs dans les cellules HEK 293a). Dans la gamme des concentrations micromolaires utilisées lors de nos expériences *in vitro*, il n'y avait aucune preuve de transport de quinacrine médié par ces transporteurs dans les fibroblastes dermiques de souris (Fig. 12 B, C). Une explication possible de cette différence entre nos résultats obtenus et ceux démontrés précédemment dans la littérature serait que des concentrations de quinacrine grandement supérieures à celles employées dans nos expériences (généralement supérieures à 50 µM) ont été utilisées dans certaines études antérieures du transport de la quinacrine (Sweet et Pritchard, 1999).

3. Flux autophagique

L'accumulation des médicaments cationiques lipophiles peut déterminer les réponses de signalisation cellulaire à la suite du tamponnage du pH lysosomal, c'està-dire une accumulation macroautophagique et de la lysosomogénèse, et ce indépendamment de la classe thérapeutique à laquelle chaque médicament appartient (voir Introduction). Ces prédictions furent confirmées et furent vérifiées dans nos modèles murins (Fig. 14 et 15), y compris dans les tissus pulmonaires provenant de souris traitées avec la quinacrine (Fig. 20).

La mesure du flux autophagique peut se faire de différentes façons. Parmi ces approches, la méthode d'immunobuvardage du marqueur autophagique LC3 demeure une des techniques les plus utilisées (Mizushima et Yoshimori, 2007). Pourtant, l'étude de cette protéine autophagique ne fournit pas une étude complète du flux autophagique. Notons qu'en plus de la protéine LC3, nous avons aussi étudié la présence de la protéine p62/SQSTM1. Le taux de dégradation de cette dernière agit comme indicateur du flux autophagique dans les cellules. Une

augmentation de la concentration cellulaire de la protéine p62/SQSTM1 découle nécessairement d'une inhibition du flux autophagique (Bjorkoy et coll., 2005). En effet, la figure 14 démontre une augmentation significative de ces deux protéines autophagiques à la suite des traitements avec la quinacrine dans les fibroblastes dermiques de souris. Une accumulation significative de LC3 II fut aussi observée chez les cellules U937 à la suite de traitements avec les 6 médicaments cationiques de la série des s-Et₃N (Fig. 33). L'inhibition du flux autophagique à la suite de traitements avec des médicaments cationiques lysosomotropiques est commune à ces deux types cellulaires.

Cette inhibition signifie que le niveau basal de l'autophagie est inhibé sans déclencher la signalisation cellulaire associée à la privation nutritionnelle, qui est associée, à son tour, à une augmentation du niveau autophagique basal (Li, Chen et Gibson, 2013). Si le tamponnage du pH des compartiments acides de la cellule est suffisant pour expliquer l'accumulation de la protéine LC3 II (Funakoshi et coll., 2013), il serait donc possible de reproduire son accumulation avec des traitements avec l'inhibiteur de la pompe V-ATPase, la bafilomycine A1. Cette hypothèse fut vérifiée dans le système actuel (Fig. 14 A). De plus, les expériences avec la spautin-1 démontraient que l'accumulation autophagique est secondaire et n'a aucune incidence sur le transport de la quinacrine (Fig. 13).

4. Lysosomogénèse

La localisation nucléaire du facteur de transcription EB et l'augmentation des concentrations des ARNm de LAMP1 et LAMP2 étaient des réponses que nous avons observées à la suite de traitements avec la quinacrine chez les fibroblastes dermiques de souris (Fig. 16). Ces réponses précédaient la surexpression des protéines lysosomales LAMP1 et LAMP2 (Fig. 15). Le TFEB contrôle aussi l'expression des gènes autophagiques (Settembre et Ballabio, 2014). Par contre, l'activité de la cathepsine D ne fut pas altérée dans les fibroblastes dermiques de souris traitées avec la quinacrine (Fig. 17). La maturation de la proenzyme de la cathepsine, un clivage lié à l'environnement acide des lysosomes matures (Liu et

coll., 2014), peut être altérée par l'effet de la quinacrine sur le pH des lysosomes. Alors, chez les cellules où les autophagosomes ont accumulé une quantité excessive de quinacrine, une lysosomogénèse est observée à la suite de cette accumulation. Ce mécanisme cellulaire fait partie d'une rétroaction finement régulée qui maintient l'activité de cette hydrolase lysosomale constante.

5. Effet antiprolifératif des amines

Lors de nos études de la prolifération cellulaire et de l'effet de traitements avec les médicaments cationiques lysosomotropiques sur cette dernière, nous avons utilisé 4 lignées cellulaires. Avec les traitements témoins (véhicule), tous les types cellulaires étaient prolifératifs (Fig. 26). Par contre, les traitements avec tous les 6 s-Et₃N ont significativement diminué la prolifération de tous les lignées cellulaires. La puissance de chacun des s-Et₃N variait entre les lignées cellulaires, mais elle était tout de même semblable. Enfin, les Cl₅₀ de chaque médicament cationique lysosomotropique sont inversement corrélées à sa lipophilicité exprimée en valeur de logP (Fig. 27).

Une corrélation plus précise entre la puissance de l'effet antiprolifératif et l'accumulation relativement rapide de l'effecteur autophagique LC3 II a été établie en réponse aux différents s-Et₃N (Fig. 34). L'observation de cette accumulation rapide suggère que la réponse tardive est déterminée au début de la séquestration des médicaments cationiques lysosomotropiques dans les compartiments acides des cellules. Ces conséquences découlent de l'incompétence lysosomale. Il est important d'observer que les traitements avec l'amiodarone à la concentration de 25 µM était cytotoxique. Les cellules traitées avec cette concentration démontraient une diminution anormale de l'effecteur autophagique LC3 II par rapport aux cellules traitées avec des concentrations tolérées (Fig. 33).

Dans une étude récente, le médicament cationique lipophile, leelamine, induisait l'apoptose dans une lignée cellulaire tumorale. Cette induction était parallèle à l'accumulation de cholestérol libre, mais renversée par la présence de la β-

cyclodextrine. Nous avons observé une inhibition partielle de l'effet antiprolifératif de toutes les 6 s-Et₃N de la série chez les cellules U937 avec des cotraitements de β -cyclodextrine (Fig. 37) et nous avons étendu notre approche avec un médicament qui inhibe la synthèse du cholestérol : une statine (lovastatine) (Fig. 38).

Les interventions anti-cholestérol n'ont eu aucun effet significatif sur l'inhibition du flux autophagique des s-Et₃N (Fig. 41) et sur le transport de la quinacrine (Fig. 40) dans les cellules U937. Par contre, la β -cyclodextrine peut potentiellement redistribuer le cholestérol dans les compartiments cellulaires. Ajoutons qu'un dérivé de cyclodextrine est présentement à l'étude afin d'éliminer le cholestérol accumulé dans les lysosomes chez les patients atteints de la maladie de Niemann-Pick du type C (Santos-Lozano et coll., 2015). De plus, il a été démontré que la β -cyclodextrine renverse l'accumulation du cholestérol dans les plaques athérosclérotiques dans des modèles animaux (Zimmer et coll., 2016).

Le taux de cholestérol libre ou estérifié sur une période de 48 h chez les cellules U937 est demeuré inchangé lors des deux interventions à une concentration de s-Et₃N qui n'était pas toxique pour les cellules (Fig. 42 A). Ces résultats confirment l'hypothèse affirmant qu'il existe une tolérance étroite lors d'une déplétion du cholestérol dans les cellules (Burke et Kukoly, 2008). De plus, au moment de l'analyse, seul un des deux s-Et₃N testés à une concentration cytostatique a augmenté de manière significative le niveau de cholestérol dans les cellules U937 (Fig. 42 B).

7. Transferrine

La cytopathologie causée par la séquestration des amines démontre également une dépression non spécifique du trafic vacuolaire affectant à la fois l'endocytose et l'exocytose (Marceau et coll., 2012). La privation en fer crée un arrêt mitotique désynchronisé similaire à celui après des traitements avec des médicaments cationiques lysosomotropiques (Trowbridge et Lopez, 1982 ; Daniels et coll., 2006).

Cependant, la diminution de la capture endosomale de la transferrine suivant des traitements avec les s-Et₃N n'était pas affectée par des cotraitements avec la β -cyclodextrine (Fig. 43). Kuzu et coll. (2014) ont observé une inhibition de l'endocytose induite par les récepteurs sous traitement à leelamine. Toutefois, ils étaient tout de même plus intéressés à étudier les niveaux de concentration cytotoxiques de leur médicament cationique. Il serait essentiel de poursuivre les recherches, notamment des études ultrastructurales des autophagosomes et de la phospholipidose, afin d'identifier l'étape critique sensible à la redistribution cellulaire du cholestérol. Cette redistribution peut mener à un arrêt mitotique dans les cellules traitées avec les médicaments cationiques lysosomotropiques.

8. Essais supplémentaires (cycle cellulaire, apoptose et cytotoxicité)

D'autres types d'effets pharmacodynamiques peuvent être causés par la série des médicaments cationiques lysosomotropiques testés. La toxicité observée à 5 mM (Fig. 35 et 36) peut être expliquée par la cytotoxicité mitochondriale connue de la lidocaïne à des concentrations micromolaires (Johnson et coll., 2004). Par contre, le mécanisme de transport ou d'extrusion peut fonctionner dans la membrane plasmique des cellules et il peut aussi moduler l'activité apparente des médicaments cationiques antiprolifératifs d'un type de cellule à l'autre. Ceci pourrait expliquer que l'amiodarone et l'hydroxychloroquine présentent une puissance antiproliférative assez variable d'un type cellulaire à l'autre (Fig. 35). Cependant, nos expériences antérieures avec des inhibiteurs des transporteurs membranaires (PGP et OCT) ne démontraient aucun mécanisme de transport de la quinacrine dans la membrane plasmique des fibroblastes dermiques de souris (Fig. 12).

Quelques s-Et₃N à certaines concentrations ont une certaine affinité pour l'ADN : la chloroquine (10-500 μ M ; Allison et coll., 1965), la quinacrine (Ehsanian et coll., 2011 ; Macfarlane et Manzel, 1998) et la procainamide (Thomas et Messner, 1986). Par contre, le médicament de la série qui se prête le mieux à l'imagerie cellulaire via sa fluorescence verte intrinsèque, soit la quinacrine, n'a pas marqué les noyaux des cellules U937, et ce même avec un cotraitement avec la bafilomycine A1 (Fig. 32).

Cette absence de marquage exclut la liaison à l'ADN comme explication de l'accumulation du médicament dans les cellules traitées.

En plus des expériences d'imagerie cellulaire, des essais des phases du cycle cellulaire (Fig. 28 et 29) et des immunobuvardages de la protéine pRB (Fig. 30 et 31) furent effectués. Ces essais chez les cellules U937 et les HUVECs étaient afin d'étudier l'effet de certains nécessaires s-Et₃N (la quinacrine, l'hydroxychloroquine et la procainamide) sur le cycle cellulaire et sur l'expression de la protéine apoptotique pRB. Les figures 28 et 29 ne démontrent aucun effet significatif sur chacune des phases du cycle cellulaire des deux types de cellules traitées avec les s-Et₃N. Une augmentation dans le taux d'hypophosphorylation de la protéine pRB indiquerait une suppression dans le cycle cellulaire (spécifiquement dans dans la phase G1). Par contre, il n'y avait aucun changement statistiquement significatif dans le taux d'hypophosphorylation de la protéine pRB chez les cellules U937 et les HUVECs (Fig. 30 et 31 respectivement). Tout compte fait, les résultats démontrent que les s-Et₃N induisent un arrêt mitotique désynchronisé.

9. Expériences in vivo

La cytopathologie causée à la suite de la séquestration des cations découle de la migration du médicament du cytosol vers les régions acides de la cellule (De Duve et coll., 1974), mais la sélectivité apparente de la formation du réservoir d'un tissu à l'autre est intrigante (Fig. 18 et 19). La haute densité de macrophages dans certains organes comme les poumons, la rate et le foie peut expliquer l'accumulation significative de la quinacrine comparativement aux autres organes pauvres en macrophages résiduels (le cerveau, le cœur, etc.). Une explication possible de cette sélectivité tissulaire serait la présence d'un réservoir plus grand de compartiments acides dans certains types de cellules ou une lysosomogénèse plus vigoureuse. Cette hypothèse permettrait d'expliquer l'affinité élevée observée des phagocytes matures pour les médicaments basiques (Roy et coll., 2013). La fluorescence de la quinacrine fut également remarquée dans une tumeur formée par une lignée de

cellules de gliomes humaines transplantées chez des souris qui furent traitées avec la quinacrine à 50 mg/kg (Golden et coll., 2015).

Puisque l'inactivation génétique de sous-unités essentielles à la pompe V-ATPase détermine une létalité embryonnaire chez la souris (Inoue et coll., 1999) et que l'inhibition pharmacologique *in vivo* de la V-ATPase semble être mal tolérée (Niikura, Takeshite et Takano, 2005), nous avons mené des expériences en utilisant des tranches fraîches de poumons et des macrophages broncho-alvéolaires traités à la bafilomycine A1 afin de démontrer le rôle principal de la pompe V-ATPase dans l'accumulation de la quinacrine chez la souris. Les cotraitements *ex vivo* avec la bafilomycine A1 chez les macrophages broncho-alvéolaires démontraient une inhibition quasi-totale de la séquestration de la quinacrine (Fig. 18 B et C). Puisque les expériences *in vivo* avec la bafilomycine A1 ne sont pas bien tolérées (voir Introduction), seules les expériences *ex vivo* peuvent démontrer le pouvoir de cet inhibiteur dans nos modèles murins (Fig. 18).



FIGURE 44 : Schéma des réponses cellulaires à la suite de traitements avec les s-Et₃N. Le mode d'action des interventions expérimentales est aussi montré.



FIGURE 45 : Schéma des réponses cellulaires à la suite de traitement avec la quinacrine.

Le mode d'action des autres médicaments ou interventions utilisées dans l'étude sont également indiqués.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Mon projet de maitrise a permis de décrire le mécanisme de la séguestration de la quinacrine médiée par la pompe V-ATPase dans un modèle murin et aussi à généraliser le modèle de l'effet cytostatique et cytotoxique à l'aide d'une série de 6 médicaments cationiques lysosomotropiques. La quinacrine, un médicament anciennement utilisé pour traiter la malaria, a été identifiée comme un inhibiteur du flux autophagique et induisait aussi une lysosomogénèse chez la souris, in vitro et in vivo. L'inhibition du flux autophagique fut démontrée par des immunobuvardages des protéines autophagiques, tandis que l'induction de la lysosomogénèse fut démontrée par différentes analyses (immunobuvardages et q-PCR) des protéines et des ARNm associées aux lysosomes. L'orientation des recherches futures serait d'identifier des biomarqueurs des réservoirs cationiques en clinique. Ces biomarqueurs pourraient être présents sous forme de protéines autophagiques, lysosomales ou sous forme d'hydrolase lysosomales immatures. À la suite des traitements avec des médicaments cationiques lysosomotropiques, il serait important d'identifier, avec l'aide de ces biomarqueurs, la présence de réservoirs cationiques dans des leucocytes périphériques (Liu et coll., 2014). La base de la distribution tissulaire préférentielle des amines reste également à être élucidée. La distribution tissulaire de la guinacrine chez les souris traitées varie considérablement d'un organe à l'autre. Par contre, nous n'avons pu démontrer un mécanisme de modulation d'absorption cellulaire par des transporteurs membranaires à des niveaux de concentrations micromolaires de guinacrine. Il est possible que les s-Et₃N lipophiles peuvent avoir un tropisme pour des cellules phagocytaires matures, par exemple les neutrophiles en circulation (Morissette et coll., 2009 ; Roy et coll., 2013) ou dans des tissus pulmonaires (Fig. 18 et 19). Une telle distorsion pharmacocinétique peut être contre-productive. Cependant, la distribution de la quinacrine dans une xénogreffe de tumeur a récemment été observée chez la souris (Golden et coll., 2015); cette observation suggère que l'étude des déterminants de la distribution tissulaire des amines soit expérimentalement accessible.

En plus de généraliser le mécanisme de la séquestration de la quinacrine dans un modèle murin, mes travaux consistaient aussi à étudier l'effet cytostatique et cytotoxique d'une série de 6 médicaments cationiques lysosomotropiques. Nous avons observé un manque de spécificité dans le type cellulaire, ainsi qu'une action graduée qui impliquait l'effet cytostatique avec des concentrations plus faibles des médicaments. Les essais du cycle cellulaire et d'apoptose avec les cellules U937 et les HUVECs traitées avec des médicaments cationiques lysosomotropiques ne démontraient aucun changement à des niveaux de concentrations cytostatiques. Nous avons démontré qu'il était possible de partiellement, mais significativement, renverser l'effet antiprolifératif des amines avec des cotraitements de β -cyclodextrine ou de lovastatine.

Concernant l'effet antiprolifératif des s-Et₃N ; la supériorité de la quinacrine sur l'hydroxychloroquine et sur la chloroquine, l'indépendance de la présence de la protéine p53 (chez les cellules U937), la présence de biomarqueurs possibles comme l'accumulation de la protéine LC3 II et de l'antagonisme par la lovastatine sont d'intérêts clinique. Comme le montrent nos expériences *in vitro* et *in vivo*, la séquestration des cations médiée par la pompe V-ATPase est associée, au-dessus d'un certain seuil de concentration, à une accumulation autophagique à la suite du blocage du flux et à une lysosomogénèse dans nos modèles murins. Les possibilités d'étudier l'effet antiprolifératif et d'identifier des biomarqueurs de l'accumulation autophagique auraient une grande importance en oncologie clinique, où on commence à exploiter les inhibiteurs de flux autophagique (voir Introduction).

BIBLIOGRAPHIE

Allison, J.L., O'Brien, R.L. and Hahn, F.E., 1965. DNA: reaction with chloroquine. *Science*, *149*(3688), pp.1111-1113.

Amaravadi, R.K., Yu, D., Lum, J.J., Bui, T., Christophorou, M.A., Evan, G.I., Thomas-Tikhonenko, A. and Thompson, C.B., 2007. Autophagy inhibition enhances therapyinduced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *The Journal of clinical investigation*, *117*(2), pp.326-336.

Amaravadi, R.K., Lippincott-Schwartz, J., Yin, X.M., Weiss, W.A., Takebe, N., Timmer, W., DiPaola, R.S., Lotze, M.T. and White, E., 2011. Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. *Clinical cancer research*, *17*(4), pp.654-666.

Anderson, N.J., Nath, R., Anderson, C.J. and Edelhauser, H.F., 1999. Comparison of preservative-free bupivacaine vs lidocaine for intracameral anesthesia: a randomized clinical trial and in vitro analysis. *American journal of ophthalmology*, *127*(4), pp.393-402.

Antonini, J.M. and Reasor, M.J., 1991. Accumulation of amiodarone and desethylamiodarone by rat alveolar macrophages in cell culture. *Biochemical pharmacology*, *42*, pp.S151-S156.

Atilla, H., Tekeli, O., Can, B., Karel, F. and Saran, Y., 2003. Effects of intracameral lidocaine on ocular tissues. *Clinical & experimental ophthalmology*, *31*(1), pp.73-77.

Bach, M.K., 1969. Reduction in the frequency of mutation to resistance to cytarabine in L1210 murine leukemic cells by treatment with quinacrine hydrochloride. *Cancer research*, *29*(10), pp.1881-1885.

Baik, J., Stringer, K.A., Mane, G. and Rosania, G.R., 2013. Multiscale distribution and bioaccumulation analysis of clofazimine reveals a massive immune systemmediated xenobiotic sequestration response. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *57*(3), pp.1218-1230.

Bao, W. and Strömblad, S., 2004. Integrin αv-mediated inactivation of p53 controls a MEK1-dependent melanoma cell survival pathway in three-dimensional collagen. *The Journal of cell biology*, *167*(4), pp.745-756.

Bawolak, M.T., Morissette, G. and Marceau, F., 2010. Vacuolar ATPase-mediated sequestration of local anesthetics in swollen macroautophagosomes. *Canadian Journal of Anesthesia/Journal canadien d'anesthésie*, *57*(3), pp.230-239.

Belkin, M., Hardy, W.G., Orr, H.C. and Lachman, A.B., 1962. Induction in vitro by autonomic drugs of cytoplasmic vacuoles in ascites tumor cells. *Journal of the National Cancer Institute*, *28*(1), pp.187-201.

Biller, H., Schachtschabel, D.O., Leising, H.B., Pfab, R. and Hess, F., 1982. [Influence of x-rays and quinacrine (atebrine) or chloroquine (resochine)--alone or in combination--on growth and melanin formation of Harding-Passey melanoma cells in monolayer culture]. *Strahlentherapie*, *158*(7), pp.450-456.

Bjørkøy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Øvervatn, A., Stenmark, H. and Johansen, T., 2005. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *The Journal of cell biology*, *171*(4), pp.603-614.

Boilard, E., Paré, G., Rousseau, M., Cloutier, N., Dubuc, I., Lévesque, T., Borgeat, P. and Flamand, L., 2014. Influenza virus H1N1 activates platelets through FcγRIIA signaling and thrombin generation. *Blood*, 123(18), pp.2854-2863.

Burke, L.P. and Kukoly, C.A., 2008. Statins induce lethal effects in acute myeloblastic leukemia cells within 72 hours. *Leukemia & lymphoma*, *49*(2), pp.322-330.

Cepeda, M.S., Tzortzopoulou, A., Thackrey, M., Hudcova, J., Arora Gandhi, P. and Schumann, R., 2012. Cochrane Review: Adjusting the pH of lidocaine for reducing pain on injection. *Evidence-Based Child Health: A Cochrane Review Journal*, *7*(1), pp.149-215.

Chan, E.Y., 2012. Regulation and function of uncoordinated-51 like kinase proteins. *Antioxidants & redox signaling*, *17*(5), pp.775-785.

Charlier, R., Deltour, G., Tondeur, R. and Binon, F., 1962. [Studies in the benzofuran series. VII. Preliminary pharmacological study of 2-butyl-3-(3, 5-diiodo-4-beta-N-diethylaminoethoxybenzoyl)-benzofuran]. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie*, *139*, pp.255-264.

Chen, P.M., Gombart, Z.J. and Chen, J.W., 2011. Chloroquine treatment of ARPE-19 cells leads to lysosome dilation and intracellular lipid accumulation: possible implications of lysosomal dysfunction in macular degeneration. *Cell & bioscience*, 1(1), p.1.

Chen, P.M., Gombart, Z.J. and Chen, J.W., 2011. Chloroquine treatment of ARPE-19 cells leads to lysosome dilation and intracellular lipid accumulation: possible implications of lysosomal dysfunction in macular degeneration. *Cell & bioscience*, 1(1), p.1.

Cheng, J., Ohsaki, Y., Tauchi-Sato, K., Fujita, A. and Fujimoto, T., 2006. Cholesterol depletion induces autophagy. *Biochemical and biophysical research communications*, *351*(1), pp.246-252.

Chew, E., Ghosh, M. and McCulloch, C., 1982. Amiodarone-induced cornea verticillata. *Canadian journal of ophthalmology. Journal canadien d'ophtalmologie*, *17*(3), pp.96-99.

Codogno, P. and Meijer, A.J., 2005. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death & Differentiation*, *12*, pp.1509-1518.

Cohen, H.G. and Reynolds, T.B., 1975. Comparison of metronidazole and chloroquine for the treatment of amoebic liver abscess. A controlled trial. *Gastroenterology*, *69*(1), pp.35-41.

Cuervo, A.M., 2004. Autophagy: in sickness and in health. *Trends in cell biology*, *14*(2), pp.70-77.

Cuervo, A.M., Bergamini, E., Brunk, U.T., Dröge, W., Ffrench, M. and Terman, A., 2005. Autophagy and aging: the importance of maintaining" clean" cells. *Autophagy*, *1*(3), pp.131-140.

Daniels, T.R., Delgado, T., Rodriguez, J.A., Helguera, G. and Penichet, M.L., 2006. The transferrin receptor part I: Biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer. *Clinical immunology*, *121*(2), pp.144-158.

De Duve, C., De Barsy, T., Poole, B. and Tulkens, P., 1974. Lysosomotropic agents. *Biochemical pharmacology*, *23*(18), pp.2495IN12511-2510IN32531.

Deltour, G., Binon, F., Tondeur, R., Goldenberg, C., Henaux, F., Sion, R., Deray, E. and Charlier, R., 1962. [Studies in the benzofuran series. VI. Coronary-dilating activity of alkylated and aminoalkylated derivatives of 3-benzoylbenzofuran]. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie*, *139*, pp.247-254.

Deretic, V., Delgado, M., Vergne, I., Master, S., De Haro, S., Ponpuak, M. and Singh, S., 2009. Autophagy in immunity against mycobacterium tuberculosis: a model system to dissect immunological roles of autophagy. In *Autophagy in Infection and Immunity* (pp. 169-188). Springer Berlin Heidelberg.

Deter, R.L. and De Duve, C., 1967. Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *The Journal of cell biology*, *33*(2), pp.437-449.

Deter, R.L., Baudhuin, P. and De Duve, C., 1967. Participation of lysosomes in cellular autophagy induced in rat liver by glucagon. *The Journal of cell biology*, *35*(2), pp.C11-C16.

Di Bartolomeo, S., Corazzari, M., Nazio, F., Oliverio, S., Lisi, G., Antonioli, M., Pagliarini, V., Matteoni, S., Fuoco, C., Giunta, L. and D'Amelio, M., 2010. The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. *The Journal of cell biology*, *191*(1), pp.155-168.

Diao, L., Ekins, S. and Polli, J.E., 2010. Quantitative structure activity relationship for inhibition of human organic cation/carnitine transporter. *Molecular pharmaceutics*, 7(6), pp.2120-2131.

Diepholz, M., Börsch, M. and Böttcher, B., 2008. Structural organization of the V-ATPase and its implications for regulatory assembly and disassembly. *Biochemical Society Transactions*, *36*(5), pp.1027-1031.

Doglia, S., Gräslund, A. and Ehrenberg, A., 1985. Specific interactions between quinacrine and self-complementary deoxydinucleotides. *Anticancer research*, *6*(6), pp.1363-1368.

Dooley, H.C., Razi, M., Polson, H.E., Girardin, S.E., Wilson, M.I. and Tooze, S.A., 2014. WIPI2 links LC3 conjugation with PI3P, autophagosome formation, and pathogen clearance by recruiting Atg12–5-16L1. *Molecular cell*, *55*(2), pp.238-252.

Dow, J.A., Davies, S.A., Guo, Y.I.Q.U.A.N., Graham, S.H.I.R.L.E.Y., Finbow, M.E. and Kaiser, K., 1997. Molecular genetic analysis of V-ATPase function in Drosophila melanogaster. *Journal of Experimental Biology*, *200*(2), pp.237-245.

Dröse, S. and Altendorf, K., 1997. Bafilomycins and concanamycins as inhibitors of V-ATPases and P-ATPases. *The Journal of experimental biology*, *200*(1), pp.1-8.

Edinger, A.L. and Thompson, C.B., 2003. Defective autophagy leads to cancer. *Cancer cell*, *4*(6), pp.422-424.

Ehsanian, R., Van Waes, C. and Feller, S.M., 2011. Beyond DNA binding-a review of the potential mechanisms mediating quinacrine's therapeutic activities in parasitic infections, inflammation, and cancers. *Cell Communication and Signaling*, *9*(1), p.1.

Erman, A., Azuri, R. and Raz, A., 1984. Prostaglandin biosynthesis in rabbit kidney: mepacrine inhibits renomedullary cyclooxygenase. *Biochemical pharmacology*, *33*(1), pp.79-82.

Ertmer, A., Huber, V., Gilch, S., Yoshimori, T., Erfle, V., Duyster, J., Elsässer, H.P. and Schätzl, H.M., 2007. The anticancer drug imatinib induces cellular autophagy. *Leukemia*, *21*(5), pp.936-942.

Fader, C.M., Sánchez, D.G., Mestre, M.B. and Colombo, M.I., 2009. TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, *1793*(12), pp.1901-1916.

Falcón-Pérez, J.M., Nazarian, R., Sabatti, C. and Dell'Angelica, E.C., 2005. Distribution and dynamics of Lamp1-containing endocytic organelles in fibroblasts deficient in BLOC-3. *Journal of cell science*, *118*(22), pp.5243-5255.

Fan, C., Wang, W., Zhao, B., Zhang, S. and Miao, J., 2006. Chloroquine inhibits cell growth and induces cell death in A549 lung cancer cells. *Bioorganic & medicinal chemistry*, *14*(9), pp.3218-3222.

Fernandes, F., Loura, L.M.S., Fedorov, A., Dixon, N., Kee, T.P., Prieto, M. and Hemminga, M.A., 2006. Binding assays of inhibitors towards selected V-ATPase domains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *1758*(11), pp.1777-1786.

Finnin, B.C., Reed, B.L. and Ruffin, N.E., 1969. The effects of osmotic pressure on procaine-induced vacuolation in cell culture. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *21*(2), pp.114-117.

Forgac, M., 2007. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nature reviews Molecular cell biology*, *8*(11), pp.917-929.

Fraser, A.G., McQueen, I.N., Watt, A.H. and Stephens, M.R., 1985. Peripheral neuropathy during longterm high-dose amiodarone therapy. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, *48*(6), pp.576-578.

Frattini, A., Orchard, P.J., Sobacchi, C., Giliani, S., Abinun, M., Mattsson, J.P., Keeling, D.J., Andersson, A.K., Wallbrandt, P., Zecca, L. and Notarangelo, L.D., 2000. Defects in TCIRG1 subunit of the vacuolar proton pump are responsible for a subset of human autosomal recessive osteopetrosis. *Nature genetics*, *25*(3), pp.343-346.

Fujita, N., Hayashi-Nishino, M., Fukumoto, H., Omori, H., Yamamoto, A., Noda, T. and Yoshimori, T., 2008. An Atg4B mutant hampers the lipidation of LC3 paralogues and causes defects in autophagosome closure. *Molecular biology of the cell*, *19*(11), pp.4651-4659.

Fuks, Z. and Smith, K.C., 1971. Effect of quinacrine on X-ray sensitivity and the repair of damaged DNA in Escherichia coli K-12. *Radiation research*, *48*(1), pp.63-73.

Funakoshi, T., Aki, T., Unuma, K. and Uemura, K., 2013. Lysosome vacuolation disrupts the completion of autophagy during norephedrine exposure in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Brain research*, *1490*, pp.9-22.

Funakoshi, T., Matsuura, A., Noda, T. and Ohsumi, Y., 1997. Analyses of APG13 gene involved in autophagy in yeast, Saccharomyces cerevisiae. *Gene*, *192*(2), pp.207-213.

Furuta, N., Fujita, N., Noda, T., Yoshimori, T. and Amano, A., 2010. Combinational soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor proteins VAMP8 and Vti1b mediate fusion of antimicrobial and canonical autophagosomes with lysosomes. *Molecular biology of the cell*, *21*(6), pp.1001-1010.

Furuya, N., Liang, X.H., and Levine, B., 2004. Autophagy and cancer. Autophagy. D.J. Klionsky, editor. Landes Bioscience. Georgetown, Texas, USA. 244–253.

Giampietri, A., Fioretti, M.C., Goldin, A. and Bonmassar, E., 1980. Drug-mediated antigenic changes in murine leukemia cells: antagonistic effects of quinacrine, an antimutagenic compound. *Journal of the National Cancer Institute*, *64*(2), pp.297-301.

Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.Y., Venter, J.C., Hutchison, C.A. and Smith, H.O., 2009. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature methods*, *6*(5), pp.343-345.

Rivera_Gil, P., Nazarenus, M., Ashraf, S. and Parak, W.J., 2012. pH-Sensitive Capsules as Intracellular Optical Reporters for Monitoring Lysosomal pH Changes Upon Stimulation. *Small*, *8*(6), pp.943-948.

Golden, E.B., Cho, H.Y., Hofman, F.M., Louie, S.G., Schönthal, A.H. and Chen, T.C., 2015. Quinoline-based antimalarial drugs: a novel class of autophagy inhibitors. *Neurosurgical Focus*, *38*(3), p.E12.

AG, G., 1954. Goodman LS, Gilman A. The pharmacological basis of therapeutics. *New York, MacMillan Publishing Co). Agbor, GA, Léopold, T., and Jeanne, NY, 2*, pp.1167-1173.

Gorbachev, A.V., Gasparian, A.V., Gurova, K.V., Gudkov, A.V. and Fairchild, R.L., 2007. Quinacrine inhibits the epidermal dendritic cell migration initiating T cellmediated skin inflammation. *European journal of immunology*, 37(8), pp.2257-2267.

Gozuacik, D. and Kimchi, A., 2004. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene*, *23*(16), pp.2891-2906.

Gunn, J.M., Clark, M.G., Knowles, S.E., Hopgood, M.F. and Ballard, F.J., 1977. Reduced rates of proteolysis in transformed cells, pp.58-60.

Gustavsson, M., Barmark, G., Larsson, J., Murén, E. and Ronne, H., 2008. Functional genomics of monensin sensitivity in yeast: implications for post-Golgi traffic and vacuolar H+-ATPase function. *Molecular Genetics and Genomics*, *280*(3), pp.233-248.

Hanada, T., Noda, N.N., Satomi, Y., Ichimura, Y., Fujioka, Y., Takao, T., Inagaki, F. and Ohsumi, Y., 2007. The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(52), pp.37298-37302.

Hara, T., Takamura, A., Kishi, C., Iemura, S.I., Natsume, T., Guan, J.L. and Mizushima, N., 2008. FIP200, a ULK-interacting protein, is required for

autophagosome formation in mammalian cells. *The Journal of cell biology*, *181*(3), pp.497-510.

Hayer-Zillgen, M., Brüss, M. and Bönisch, H., 2002. Expression and pharmacological profile of the human organic cation transporters hOCT1, hOCT2 and hOCT3. *British journal of pharmacology*, *136*(6), pp.829-836.

Henics, T. and Wheatley, D.N., 1997. Vacuolar cytoplasmic phase separation in cultured mammalian cells involves the microfilament network and reduces motional properties of intracellular water. *International journal of experimental pathology*, *78*(5), pp.343-354.

Henics, T. and Wheatley, D.N., 1999. Cytoplasmic vacuolation, adaptation and cell death: a view on new perspectives and features. *Biology of the Cell*, *91*(7), pp.485-498.

Hiller, R.I., 1970. A study of quinacrine dihydrochloride in the human breast in vitro and in vivo. *The American Journal of Surgery*, *119*(3), pp.317-321.

Honegger, U.E., Zuehlke, R.D., Scuntaro, I., Schaefer, M.H., Toplak, H. and Wiesmann, U.N., 1993. Cellular accumulation of amiodarone and desethylamiodarone in cultured human cells: Consequences of drug accumulation on cellular lipid metabolism and plasma membrane properties of chronically exposed cells. *Biochemical pharmacology*, *45*(2), pp.349-356.

Hruban, Z., Spargo, B., Swift, H., Wissler, R.W. and Kleinfeld, R.G., 1963. Focal cytoplasmic degradation. *The American journal of pathology*, *42*(6), p.657. Huang, Y., Okochi, H., May, B.C., Legname, G., Prusiner, S.B., Benet, L.Z., Guglielmo, B.J. and Lin, E.T., 2006. Quinacrine is mainly metabolized to mono-desethyl quinacrine by CYP3A4/5 and its brain accumulation is limited by P-glycoprotein. *Drug metabolism and disposition*, *34*(7), pp.1136-1144.

Huczyński, A., Ratajczak-Sitarz, M., Katrusiak, A. and Brzezinski, B., 2007. Molecular structure of the 1: 1 inclusion complex of monensin A lithium salt with acetonitrile. *Journal of Molecular Structure*, *871*(1), pp.92-97.

Inaba, M. and Maruyama, E., 1988. Reversal of resistance to vincristine in P388 leukemia by various polycyclic clinical drugs, with a special emphasis on quinacrine. *Cancer research*, *48*(8), pp.2064-2067.

Inoue, H., Noumi, T., Nagata, M., Murakami, H. and Kanazawa, H., 1999. Targeted disruption of the gene encoding the proteolipid subunit of mouse vacuolar H+-ATPase leads to early embryonic lethality. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, *1413*(3), pp.130-138.

Ishibashi, S., Yamazaki, T. and Okamoto, K., 2009. Association of autophagy with cholesterol-accumulated compartments in Niemann-Pick disease type C cells. *Journal of Clinical Neuroscience*, *16*(7), pp.954-959.

Ito, H., Daido, S., Kanzawa, T., Kondo, S. and Kondo, Y., 2005. Radiation-induced autophagy is associated with LC3 and its inhibition sensitizes malignant glioma cells. *International journal of oncology*, *26*(5), pp.1401-1410.

Jeong, H.U., Kwon, M., Lee, Y., Yoo, J.S., Shin, D.H., Song, I.S. and Lee, H.S., 2015. Organic anion transporter 3-and organic anion transporting polypeptides 1B1and 1B3-mediated transport of catalposide. *Drug design, development and therapy*, *9*, p.643.

Jung, C.H., Jun, C.B., Ro, S.H., Kim, Y.M., Otto, N.M., Cao, J., Kundu, M. and Kim, D.H., 2009. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Molecular biology of the cell*, *20*(7), pp.1992-2003.

Kabeya, Y., Mizushima, N., Yamamoto, A., Oshitani-Okamoto, S., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T., 2004. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *Journal of cell science*, *117*(13), pp.2805-2812.

Kalia, S. and Dutz, J.P., 2007. New concepts in antimalarial use and mode of action in dermatology. *Dermatologic therapy*, *20*(4), pp.160-174.

Kang, R., Zeh, H.J., Lotze, M.T. and Tang, D., 2011. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, *18*(4), pp.571-580.

Karet, F.E., Finberg, K.E., Nelson, R.D., Nayir, A., Mocan, H., Sanjad, S.A., Rodriguez-Soriano, J., Santos, F., Cremers, C.W., Di Pietro, A. and Hoffbrand, B.I., 1999. Mutations in the gene encoding B1 subunit of H+-ATPase cause renal tubular acidosis with sensorineural deafness. *Nature genetics*, *21*(1), pp.84-90.

Kaufmann, A.M. and Krise, J.P., 2007. Lysosomal sequestration of amine-containing drugs: Analysis and therapeutic implications. *Journal of pharmaceutical sciences*, *96*(4), pp.729-746.

Kim, E.L., Wüstenberg, R., Rübsam, A., Schmitz-Salue, C., Warnecke, G., Bücker, E.M., Pettkus, N., Speidel, D., Rohde, V., Schulz-Schaeffer, W. and Deppert, W., 2010. Chloroquine activates the p53 pathway and induces apoptosis in human glioma cells. *Neuro-oncology*, p.nop046.

Kim, Y.M., Jung, C.H., Seo, M., Kim, E.K., Park, J.M., Bae, S.S. and Kim, D.H., 2015. mTORC1 phosphorylates UVRAG to negatively regulate autophagosome and endosome maturation. *Molecular cell*, *57*(2), pp.207-218.

Kimura, T., Takabatake, Y., Takahashi, A. and Isaka, Y., 2013. Chloroquine in cancer therapy: a double-edged sword of autophagy. *Cancer research*, *73*(1), pp.3-7.

Kirkegaard, K., Taylor, M.P. and Jackson, W.T., 2004. Cellular autophagy: surrender, avoidance and subversion by microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*, *2*(4), pp.301-314.

Kisen, G.Ø., Tessitore, L., Costelli, P., Gordon, P.B., Schwarze, P.E., Baccino, F.M. and Seglen, P.O., 1993. Reduced autophagic activity in primary rat hepatocellular carcinoma and ascites hepatoma cells. *Carcinogenesis*, *14*(12), pp.2501-2505.

Kitagawa, N., Mazon, H., Heck, A.J. and Wilkens, S., 2008. Stoichiometry of the peripheral stalk subunits E and G of yeast V1-ATPase determined by mass spectrometry. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(6), pp.3329-3337.

Klee, M. and Pimentel-Muiños, F.X., 2005. Bcl-XL specifically activates Bak to induce swelling and restructuring of the endoplasmic reticulum. *The Journal of cell biology*, *168*(5), pp.723-734.

Klionsky, D.J., 2008. Autophagy revisited: a conversation with Christian de Duve. *Autophagy*, *4*(6), pp.740-743.

Klionsky, D.J. and Emr, S.D., 2000. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*, *290*(5497), pp.1717-1721.

Kobayashi, S., 2014. Choose Delicately and Reuse Adequately: The Newly Revealed Process of Autophagy. *Biological & pharmaceutical bulletin*, *38*(8), pp.1098-1103.

Kodama, I., Kamiya, K. and Toyama, J., 1999. Amiodarone: ionic and cellular mechanisms of action of the most promising class III agent. *The American journal of cardiology*, *84*(9), pp.20-28.

Kornak, U., Schulz, A., Friedrich, W., Uhlhaas, S., Kremens, B., Voit, T., Hasan, C., Bode, U., Jentsch, T.J. and Kubisch, C., 2000. Mutations in the a3 subunit of the vacuolar H+-ATPase cause infantile malignant osteopetrosis. *Human Molecular Genetics*, *9*(13), pp.2059-2063.

Koumbadinga, G.A., Désormeaux, A., Adam, A. and Marceau, F., 2010. Effect of interferon-γ on inflammatory cytokine-induced bradykinin B 1 receptor expression in human vascular cells. *European journal of pharmacology*, *647*(1), pp.117-125.

Krafts, K., Hempelmann, E. and Skórska-Stania, A., 2012. From methylene blue to chloroquine: a brief review of the development of an antimalarial therapy. *Parasitology research*, *111*(1), pp.1-6.

Kurup, P., Zhang, Y., Xu, J., Venkitaramani, D.V., Haroutunian, V., Greengard, P., Nairn, A.C. and Lombroso, P.J., 2010. Aβ-mediated NMDA receptor endocytosis in Alzheimer's disease involves ubiquitination of the tyrosine phosphatase STEP61. *The Journal of Neuroscience*, *30*(17), pp.5948-5957.

Kuzu, O.F., Gowda, R., Sharma, A. and Robertson, G.P., 2014. Leelamine mediates cancer cell death through inhibition of intracellular cholesterol transport. *Molecular cancer therapeutics*, *13*(7), pp.1690-1703.

Laflamme, C., et al. "Evidence of impairment of normal inflammatory reaction by a high-fat diet." *Genes & Immunity* 15.4 (2014).

Laing, C.M., Toye, A.M., Capasso, G. and Unwin, R.J., 2005. Renal tubular acidosis: developments in our understanding of the molecular basis. *The international journal of biochemistry & cell biology*, *37*(6), pp.1151-1161.

Lard, L.R., Visser, H., Speyer, I., vander Horst-Bruinsma, I.E., Zwinderman, A.H., Breedveld, F.C. and Hazes, J.M., 2001. Early versus delayed treatment in patients with recent-onset rheumatoid arthritis: comparison of two cohorts who received different treatment strategies. *The American journal of medicine*, *111*(6), pp.446-451.

Levine, B. and Klionsky, D.J., 2004. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Developmental cell*, *6*(4), pp.463-477.

Li, L., Chen, Y. and Gibson, S.B., 2013. Starvation-induced autophagy is regulated by mitochondrial reactive oxygen species leading to AMPK activation. *Cellular signalling*, *25*(1), pp.50-65.

Liang, C., Lee, J.S., Inn, K.S., Gack, M.U., Li, Q., Roberts, E.A., Vergne, I., Deretic, V., Feng, P., Akazawa, C. and Jung, J.U., 2008. Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nature cell biology*, *10*(7), pp.776-787.

Liang, X.H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H. and Levine, B., 1999. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*, *402*(6762), pp.672-676.

Liang, X.H., Yu, J., Brown, K. and Levine, B., 2001. Beclin 1 contains a leucine-rich nuclear export signal that is required for its autophagy and tumor suppressor function. *Cancer research*, *61*(8), pp.3443-3449.

Livesey, K.M., Tang, D., Zeh, H.J. and Lotze, M.T., 2009. Autophagy inhibition in combination cancer treatment. *Current opinion in investigational drugs (London, England: 2000)*, *10*(12), pp.1269-1279.

Liu, J., Xia, H., Kim, M., Xu, L., Li, Y., Zhang, L., Cai, Y., Norberg, H.V., Zhang, T., Furuya, T. and Jin, M., 2011. Beclin1 controls the levels of p53 by regulating the deubiquitination activity of USP10 and USP13. *Cell*, 147(1), pp.223-234.

Liu, B., Fang, M., Hu, Y., Huang, B., Li, N., Chang, C., Huang, R., Xu, X., Yang, Z., Chen, Z. and Liu, W., 2014. Hepatitis B virus X protein inhibits autophagic degradation by impairing lysosomal maturation. *Autophagy*, *10*(3), pp.416-430.

Löfgren, N., Lundqvist, B., 1946. Studies on local anaesthetics II. *Svensk Kemisk Tidskrift*, 58, pp.206–217.

Logan, R., Kong, A.C. and Krise, J.P., 2014. Time-Dependent Effects of Hydrophobic Amine-Containing Drugs on Lysosome Structure and Biogenesis in Cultured Human Fibroblasts. *Journal of pharmaceutical sciences*, *103*(10), pp.3287-3296.

Macfarlane, D.E. and Manzel, L., 1998. Antagonism of immunostimulatory CpGoligodeoxynucleotides by quinacrine, chloroquine, and structurally related compounds. *The Journal of Immunology*, *160*(3), pp.1122-1131.

Maclean, K.H., Dorsey, F.C., Cleveland, J.L. and Kastan, M.B., 2008. Targeting lysosomal degradation induces p53-dependent cell death and prevents cancer in mouse models of lymphomagenesis. *The Journal of clinical investigation*, *118*(1), pp.79-88.

Malkinson, F.D. and Levitt, L., 1980. Hydroxychloroquine treatment of porphyria cutanea tarda. *Archives of dermatology*, *116*(10), p.1147.

Marceau, F., Bawolak, M.T., Bouthillier, J. and Morissette, G., 2009. Vacuolar ATPase-mediated cellular concentration and retention of quinacrine: a model for the distribution of lipophilic cationic drugs to autophagic vacuoles. *Drug Metabolism and Disposition*, *37*(12), pp.2271-2274.

Marceau, F., Roy, C. and Bouthillier, J., 2013. Assessment of cation trapping by cellular acidic compartments. *Methods in enzymology*, *534*, pp.119-131.

Marceau, F., Bawolak, M.T., Lodge, R., Bouthillier, J., Gagné-Henley, A., René, C. and Morissette, G., 2012. Cation trapping by cellular acidic compartments: beyond the concept of lysosomotropic drugs. *Toxicology and applied pharmacology*, *259*(1), pp.1-12.

Mark, L.C., Kayden, H.J., Steele, J.M., Cooper, J.R., Berlin, I., Rovenstine, E.A. and Brodie, B.B., 1951. The physiological disposition and cardiac effects of procaine amide. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *102*(1), pp.5-15.

Marti-Carvajal, A.J., Simancas-Racines, D., Anand, V. and Bangdiwala, S., 2015. Prophylactic lidocaine for myocardial infarction. *COCHRANE DATABASE OF SYSTEMATIC REVIEWS*, (8).

Mastaglia, F.L., Papadimitriou, J.M., Dawkins, R.L. and Beveridge, B., 1977. Vacuolar myopathy associated with chloroquine, lupus erythematosus and thymoma: report of a case with unusual mitochondrial changes and lipid accumulation in muscle. *Journal of the neurological sciences*, *34*(3), pp.315-328.

Matsuura, A., Tsukada, M., Wada, Y. and Ohsumi, Y., 1997. Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in Saccharomyces cerevisiae. *Gene*, *192*(2), pp.245-250.

McCormick, D.L., 1988. Anticarcinogenic activity of quinacrine in the rat mammary gland. *Carcinogenesis*, *9*(1), pp.175-178.

McMahon, G.A., Petitclerc, E., Stefansson, S., Smith, E., Wong, M.K., Westrick, R.J., Ginsburg, D., Brooks, P.C. and Lawrence, D.A., 2001. Plasminogen activator inhibitor-1 regulates tumor growth and angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 276(36), pp.33964-33968.

Meinao, I.M., Sato, E.I., Andrade, L.E.C., Ferraz, M.B. and Atra, E., 1996. Controlled trial with chloroquine diphosphate in systemic lupus erythematosus. *Lupus*, *5*(3), pp.237-241.

Meléndez, A. and Levine, B., 2005. Autophagy in C. elegans.

Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T. and Ohsumi, Y., 2004. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Molecular biology of the cell*, *15*(3), pp.1101-1111.

Mizushima, N. and Yoshimori, T., 2007. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*, *3*(6), pp.542-545.

Mizushima, N., Yoshimori, T. and Levine, B., 2010. Methods in mammalian autophagy research. *Cell*, *140*(3), pp.313-326.

Morissette, G., Moreau, E., René, C. and Marceau, F., 2004. Massive cell vacuolization induced by organic amines such as procainamide. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *310*(1), pp.395-406.

Morissette, G., Moreau, E., René, C. and Marceau, F., 2005. N-substituted 4aminobenzamides (procainamide analogs): an assessment of multiple cellular effects concerning ion trapping. *Molecular pharmacology*, *68*(6), pp.1576-1589. Morissette, G., Germain, L. and Marceau, F., 2007. The antiwrinkle effect of topical concentrated 2-dimethylaminoethanol involves a vacuolar cytopathology. *British Journal of Dermatology*, *156*(3), pp.433-439.

Morissette, G., Lodge, R. and Marceau, F., 2008a. Intense pseudotransport of a cationic drug mediated by vacuolar ATPase: procainamide-induced autophagic cell vacuolization. *Toxicology and applied pharmacology*, 228(3), pp.364-377.

Morissette, G., Couture, J.P., Désormeaux, A., Adam, A. and Marceau, F., 2008b. Lack of direct interaction between enalaprilat and the kinin B 1 receptors. *Peptides*, *29*(4), pp.606-612.

Morissette, G., Ammoury, A., Rusu, D., Marguery, M.C., Lodge, R., Poubelle, P.E. and Marceau, F., 2009. Intracellular sequestration of amiodarone: role of vacuolar ATPase and macroautophagic transition of the resulting vacuolar cytopathology. *British journal of pharmacology*, *157*(8), pp.1531-1540.

Morissette, G., Bawolak, M.T. and Marceau, F., 2011. Dissociation of the vacuolar and macroautophagic cytopathology from the cytotoxicity induced by the lipophilic local anesthetic bupivacaine. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, *89*(7), pp.505-512.

Moriyama, Y.O.S.H.I.N.O.R.I., 1996. Membrane energization by proton pumps is important for compartmentalization of drugs and toxins: a new type of active transport. *The Journal of experimental biology*, *199*(7), pp.1447-1454.

Muench, S.P., Huss, M., Song, C.F., Phillips, C., Wieczorek, H., Trinick, J. and Harrison, M.A., 2009. Cryo-electron microscopy of the vacuolar ATPase motor reveals its mechanical and regulatory complexity. *Journal of molecular biology*, *386*(4), pp.989-999.

Newman, C.M., Price, A., Davies, D.W., Gray, T.A. and Weetman, A.P., 1998. Amiodarone and the thyroid: a practical guide to the management of thyroid dysfunction induced by amiodarone therapy. *Heart*, *79*(2), pp.121-127.

Nicholson, D.W., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., Labelle, M., Lazebnik, Y.A. and Munday, N.A., 1995. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, *376*(6535), pp.37-43.

Nies, A.T., Koepsell, H., Damme, K. and Schwab, M., 2011. Organic cation transporters (OCTs, MATEs), in vitro and in vivo evidence for the importance in drug therapy. In *Drug Transporters* (pp. 105-167). Springer Berlin Heidelberg.

Niikura, K., Takeshita, N. and Takano, M., 2005. A vacuolar ATPase inhibitor, FR167356, prevents bone resorption in ovariectomized rats with high potency and

specificity: potential for clinical application. *Journal of Bone and Mineral Research*, *20*(9), pp.1579-1588.

Nioi, P., Perry, B.K., Wang, E.J., Gu, Y.Z. and Snyder, R.D., 2007. In Vitro Detection of Drug-Induced Phospholipidosis Using Gene Expression and Fluorescent Phospholipid–Based Methodologies. *Toxicological sciences*, *99*(1), pp.162-173.

O'Brien, R.L., Olenick, J.G. and Hahn, F.E., 1966. Reactions of quinine, chloroquine, and quinacrine with DNA and their effects on the DNA and RNA polymerase reactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *55*(6), pp.1511-1517.

O'Dell, J.R., Haire, C.E., Erikson, N., Drymalski, W., Palmer, W., Eckhoff, P.J., Garwood, V., Maloley, P., Klassen, L.W., Wees, S. and Klein, H., 1996. Treatment of rheumatoid arthritis with methotrexate alone, sulfasalazine and hydroxychloroquine, or a combination of all three medications. *New England Journal of Medicine*, *334*(20), pp.1287-1291.

Oda, K., Koriyama, Y., Yamada, E. and Ikehara, Y., 1986. Effects of weakly basic amines on proteolytic processing and terminal glycosylation of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *Biochemical Journal*, *240*(3), pp.739-745.

Ogier-Denis, E. and Codogno, P., 2003. Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, *1603*(2), pp.113-128.

Ogier-Denis, E., Houri, J.J., Bauvy, C. and Codogno, P., 1996. Guanine nucleotide exchange on heterotrimeric Gi3 protein controls autophagic sequestration in HT-29 cells. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(45), pp.28593-28600.

Ohkuma, S. and Poole, B., 1981. Cytoplasmic vacuolation of mouse peritoneal macrophages and the uptake into lysosomes of weakly basic substances. *The Journal of cell biology*, *90*(3), pp.656-664.

Oliverio, S., Amendola, A., Di Sano, F.E.D.E.R.I.C.A., Farrace, M.G., Fesus, L., Nemes, Z., Piredda, L., Spinedi, A. and Piacentini, M., 1997. Tissue transglutaminase-dependent posttranslational modification of the retinoblastoma gene product in promonocytic cells undergoing apoptosis. *Molecular and cellular biology*, *17*(10), pp.6040-6048.

Panagiotou, I., Doris, M., Karnesis, L., Tsakanika, K., Ladakis, C., Kanakakis, K., Spiridakis, E., Bouros, D. and Kotoulas, C., 2011. Acute fatal amiodarone-induced lung toxicity after CABG surgery. *Respiratory Medicine CME*, *4*(1), pp.37-39.

Park, S., Choi, S.G., Yoo, S.M., Son, J.H. and Jung, Y.K., 2014. Choline dehydrogenase interacts with SQSTM1/p62 to recruit LC3 and stimulate mitophagy. *Autophagy*, *10*(11), pp.1906-1920.
Parks, A., Charest-Morin, X., Boivin-Welch, M., Bouthillier, J. and Marceau, F., 2015. Autophagic flux inhibition and lysosomogenesis ensuing cellular capture and retention of the cationic drug quinacrine in murine models. *PeerJ*, *3*, p.e1314.

Parks, A. and Marceau, F., 2016. Lysosomotropic cationic drugs induce cytostatic and cytotoxic effects: Role of liposolubility and autophagic flux and antagonism by cholesterol ablation. Toxicology and Applied Pharmacology.

Patel, A.S., Lin, L., Geyer, A., Haspel, J.A., An, C.H., Cao, J., Rosas, I.O. and Morse, D., 2012. Autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis. *PloS one*, *7*(7), p.e41394.

Peña-Llopis, S., Vega-Rubin-de-Celis, S., Schwartz, J.C., Wolff, N.C., Tran, T.A.T., Zou, L., Xie, X.J., Corey, D.R. and Brugarolas, J., 2011. Regulation of TFEB and V-ATPases by mTORC1. *The EMBO journal*, *30*(16), pp.3242-3258.

Petersen, C.S. and Thomsen, K., 1992. High-dose hydroxychloroquine treatment of porphyria cutane tarda. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *26*(4), pp.614-619.

Petri, M., Lakatta, C., Magder, L. and Goldman, D., 1994. Effect of prednisone and hydroxychloroquine on coronary artery disease risk factors in systemic lupus erythematosus: a longitudinal data analysis. *The American journal of medicine*, *96*(3), pp.254-259.

Pfab, R., Schachtschabel, D.O. and Kern, H.F., 1985. [Ultrastructural studies of the effect of x-rays and quinacrine (Atebrin) or chloroquine (Resochin)--alone or in combination--on Harding-Passey melanoma cells in monolayer culture]. *Strahlentherapie*, *161*(11), pp.711-718.

Piccoli, E., Nadai, M., Caretta, C.M., Bergonzini, V., Del Vecchio, C., Ha, H.R., Bigler, L., Dal Zoppo, D., Faggin, E., Pettenazzo, A. and Orlando, R., 2011. Amiodarone impairs trafficking through late endosomes inducing a Niemann-Pick C-like phenotype. *Biochemical pharmacology*, *82*(9), pp.1234-1249.

Poklepovic, A. and Gewirtz, D.A., 2014. Outcome of early clinical trials of the combination of hydroxychloroquine with chemotherapy in cancer. *Autophagy*, *10*(8), pp.1478-1480.

Ponge, T., Mussini, J.M., Ponge, A., Forgeau, Y., Barrier, J., Cottin, S. and Grolleau, J.Y., 1986. [Primary Gougerot-Sjogren syndrome with necrotizing polymyositis: favorable effect of hydroxychloroquine]. *Revue neurologique*, *143*(2), pp.147-148.

Poole, B., Ohkuma, S. and Warburton, M.J., 1977. The accumulation of weakly basic substances in lysosomes and the inhibition of intracellular protein degradation. *Acta biologica et medica Germanica*, *36*(11-12), p.1777.

Proikas-Cezanne, T., Waddell, S., Gaugel, A., Frickey, T., Lupas, A. and Nordheim, A., 2004. WIPI-1 α (WIPI49), a member of the novel 7-bladed WIPI protein family, is aberrantly expressed in human cancer and is linked to starvation-induced autophagy. *Oncogene*, *23*(58), pp.9314-9325.

Qi, J., Wang, Y. and Forgac, M., 2007. The vacuolar (H+)-ATPase: subunit arrangement and in vivo regulation. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 39(5-6), pp.423-426.

Qu, X., Yu, J., Bhagat, G., Furuya, N., Hibshoosh, H., Troxel, A., Rosen, J., Eskelinen, E.L., Mizushima, N., Ohsumi, Y. and Cattoretti, G., 2003. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *The Journal of clinical investigation*, *112*(12), pp.1809-1820.

Rahim, R. and Strobl, J.S., 2009. Hydroxychloroquine, chloroquine, and all-trans retinoic acid regulate growth, survival, and histone acetylation in breast cancer cells. *Anti-cancer drugs*, *20*(8), pp.736-745.

Ramachandran, N., Munteanu, I., Wang, P., Ruggieri, A., Rilstone, J.J., Israelian, N., Naranian, T., Paroutis, P., Guo, R., Ren, Z.P. and Nishino, I., 2013. VMA21 deficiency prevents vacuolar ATPase assembly and causes autophagic vacuolar myopathy. *Acta neuropathologica*, *125*(3), pp.439-457.

Rautio, J., Humphreys, J.E., Webster, L.O., Balakrishnan, A., Keogh, J.P., Kunta, J.R., Serabjit-Singh, C.J. and Polli, J.W., 2006. In vitro p-glycoprotein inhibition assays for assessment of clinical drug interaction potential of new drug candidates: a recommendation for probe substrates. *Drug metabolism and disposition*, *34*(5), pp.786-792.

Reasor, M.J. and Kacew, S., 2001. Drug-induced phospholipidosis: are there functional consequences?. *Experimental Biology and Medicine*, 226(9), pp.825-830.

Reasor, M.J., Hastings, K.L. and Ulrich, R.G., 2006. Drug-induced phospholipidosis: issues and future directions. *Expert opinion on drug safety*, *5*(4), pp.567-583.

Reggiori, F. and Klionsky, D.J., 2002. Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryotic cell*, *1*(1), pp.11-21.

Roczniak-Ferguson, A., Petit, C.S., Froehlich, F., Qian, S., Ky, J., Angarola, B., Walther, T.C. and Ferguson, S.M., 2012. The transcription factor TFEB links mTORC1 signaling to transcriptional control of lysosome homeostasis. *Science signaling*, *5*(228), p.ra42.

Rosenbaum, M.B., Chiale, P.A., Halpern, M.S., Nau, G.J., Przybylski, J., Levi, R.J., Lázzari, J.O. and Elizari, M.V., 1976. Clinical efficacy of amiodarone as an antiarrhythmic agent. *The American journal of cardiology*, *38*(7), pp.934-944.

Roy, C., Gagné, V., Fernandes, M.J. and Marceau, F., 2013. High affinity capture and concentration of quinacrine in polymorphonuclear neutrophils via vacuolar ATPase-mediated ion trapping: comparison with other peripheral blood leukocytes and implications for the distribution of cationic drugs. *Toxicology and applied pharmacology*, 270(2), pp.77-86.

Russell, R.C., Tian, Y., Yuan, H., Park, H.W., Chang, Y.Y., Kim, J., Kim, H., Neufeld, T.P., Dillin, A. and Guan, K.L., 2013. ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nature cell biology*, *15*(7), pp.741-750.

Russell, R.C., Yuan, H.X. and Guan, K.L., 2014. Autophagy regulation by nutrient signaling. *Cell research*, *24*(1), pp.42-57.

Salomon, J.J., Muchitsch, V.E., Gausterer, J.C., Schwagerus, E., Huwer, H., Daum, N., Lehr, C.M. and Ehrhardt, C., 2014. The cell line NCI-H441 is a useful in vitro model for transport studies of human distal lung epithelial barrier. *Molecular pharmaceutics*, *11*(3), pp.995-1006.

Santos-Lozano, A., García, D.V., Sanchis-Gomar, F., Fiuza-Luces, C., Pareja-Galeano, H., Garatachea, N., Gadea, G.N. and Lucia, A., 2015. Niemann-Pick disease treatment: a systematic review of clinical trials.*Annals of translational medicine*, *3*(22).

Sardiello, M., Palmieri, M., di Ronza, A., Medina, D.L., Valenza, M., Gennarino, V.A., Di Malta, C., Donaudy, F., Embrione, V., Polishchuk, R.S. and Banfi, S., 2009. A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science*, *325*(5939), pp.473-477.

Satoo, K., Noda, N.N., Kumeta, H., Fujioka, Y., Mizushima, N., Ohsumi, Y. and Inagaki, F., 2009. The structure of Atg4B–LC3 complex reveals the mechanism of LC3 processing and delipidation during autophagy. *The EMBO journal*, *28*(9), pp.1341-1350.

Savarino, A., Di Trani, L., Donatelli, I., Cauda, R. and Cassone, A., 2006. New insights into the antiviral effects of chloroquine. *The Lancet infectious diseases*, *6*(2), pp.67-69.

Sawada, H., Takami, K. and Asahi, S., 2005. A toxicogenomic approach to druginduced phospholipidosis: analysis of its induction mechanism and establishment of a novel in vitro screening system. *Toxicological Sciences*, *83*(2), pp.282-292.

Schadewaldt, H., 1975. [Introduction of atebrine into materia medica]. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)*, *100*(50), pp.2583-2585.

Seral, C., Michot, J.M., Chanteux, H., Mingeot-Leclercq, M.P., Tulkens, P.M. and Van Bambeke, F., 2003. Influence of P-glycoprotein inhibitors on accumulation of

macrolides in J774 murine macrophages. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(3), pp.1047-1051.

Settembre, C. and Ballabio, A., 2014. Cell metabolism: autophagy transcribed. *Nature*, *516*(7529), pp.40-41.

Shao, S., Li, S., Qin, Y., Wang, X., Yang, Y., Bai, H., Zhou, L., Zhao, C. and Wang, C., 2014. Spautin-1, a novel autophagy inhibitor, enhances imatinib-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia. *International journal of oncology*, *44*(5), pp.1661-1668.

Shiohara, M., El-Deiry, W.S., Wada, M., Nakamaki, T., Takeuchi, S., Yang, R.O.N.G., Chen, D.L., Vogelstein, B. and Koeffler, H.P., 1994. Absence of WAF1 mutations in a variety of human malignancies. *Blood*, *84*(11), pp.3781-3784.

Singh, B.N. and Williams, E.V., 1970. The effect of amiodarone, a new anti-anginal drug, on cardiac muscle. *British journal of pharmacology*, *39*(4), pp.657-667.

Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A.M. and Czaja, M.J., 2009. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*, *458*(7242), pp.1131-1135.

Slater, A.F.G. and Cerami, A., 1992. Inhibition by chloroquine of a novel haem polymerase enzyme activity in malaria trophozoites.

Smith, A.N., Skaug, J., Choate, K.A., Nayir, A., Bakkaloglu, A., Ozen, S., Hulton, S.A., Sanjad, S.A., Al-Sabban, E.A., Lifton, R.P. and Scherer, S.W., 2000. Mutations in ATP6N1B, encoding a new kidney vacuolar proton pump 116-kD subunit, cause recessive distal renal tubular acidosis with preserved hearing. *Nature genetics*, *26*(1), pp.71-75.

Sobacchi, C., Frattini, A., Orchard, P., Porras, O., Tezcan, I., Andolina, M., Babul-Hirji, R., Baric, I., Canham, N., Chitayat, D. and Dupuis-Girod, S., 2001. The mutational spectrum of human malignant autosomal recessive osteopetrosis. *Human molecular genetics*, *10*(17), pp.1767-1773.

Solomon, V.R. and Lee, H., 2009. Chloroquine and its analogs: a new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. *European journal of pharmacology*, *625*(1), pp.220-233.

Somani, P., Simon, V.A., Temesy-Armos, P.N., Gross, S.A. and Didio, L.J., 1986. Amiodarone-associated changes in human neutrophils. *The American journal of cardiology*, *57*(8), pp.666-672.

Stover, E.H., Borthwick, K.J., Bavalia, C., Eady, N., Fritz, D.M., Rungroj, N., Giersch, A.B.S., Morton, C.C., Axon, P.R., Akil, I. and Al-Sabban, E.A., 2002. Novel ATP6V1B1 and ATP6V0A4 mutations in autosomal recessive distal renal tubular

acidosis with new evidence for hearing loss. *Journal of medical genetics*, 39(11), pp.796-803.

Sun-Wada, G.H., Wada, Y. and Futai, M., 2004. Diverse and essential roles of mammalian vacuolar-type proton pump ATPase: toward the physiological understanding of inside acidic compartments. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, *1658*(1), pp.106-114.

Susan, P.P. and Dunn, W.A., 2001. Starvation-induced lysosomal degradation of aldolase B requires glutamine 111 in a signal sequence for chaperone-mediated transport. *Journal of cellular physiology*, *187*(1), pp.48-58.

Takeda, K., Tsuneyasu, K., and Shizuo, Akira. 20013. Toll-like receptors. *Annual review of immunology*, 21.1, pp.335-376.

Takeuchi, H., Kondo, Y., Fujiwara, K., Kanzawa, T., Aoki, H., Mills, G.B. and Kondo, S., 2005. Synergistic augmentation of rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells by phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B inhibitors. *Cancer research*, *65*(8), pp.3336-3346.

Tavassoly, I., 2015. *Dynamics of Cell Fate Decision Mediated by the Interplay of Autophagy and Apoptosis in Cancer Cells: Mathematical Modeling and Experimental Observations*. Springer.

Thomas, T.J. and Messner, R.P., 1986. Effects of lupus-inducing drugs on the B to Z transition of synthetic DNA. *Arthritis & Rheumatism*, 29(5), pp.638-645.

Trowbridge, I.S. and Lopez, F., 1982. Monoclonal antibody to transferrin receptor blocks transferrin binding and inhibits human tumor cell growth in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *79*(4), pp.1175-1179.

Tsakonas, E., Joseph, L., Esdaile, J.M., Choquette, D., Senecal, J.L., Cividino, A., Danoff, D., Osterland, C.K., Yeadon, C., Smith, C.D. and Canadian Hydroxychloroquine Study Group, 1998. A long-term study of hydroxychloroquine withdrawal on exacerbations in systemic lupus erythematosus. *Lupus*, *7*(2), pp.80-85.

Tsukada, M. and Ohsumi, Y., 1993. Isolation and characterization of autophagydefective mutants of Saccharomyces cerevisiae. *FEBS letters*, *333*(1-2), pp.169-174.

Tsuruoka, S., Ioka, T., Wakaumi, M., Sakamoto, K.I., Ookami, H. and Fujimura, A., 2006. Severe arrhythmia as a result of the interaction of cetirizine and pilsicainide in a patient with renal insufficiency: first case presentation showing competition for excretion via renal multidrug resistance protein 1 and organic cation transporter 2. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, *79*(4).

Vallance, H., Chaba, T., Clarke, L. and Taylor, G., 2004. Pseudo-lysosomal storage disease caused by EMLA cream. *Journal of inherited metabolic disease*, *27*(4), pp.507-511.

Van Der Heijde, D., Van Riel, P., Gribnau, F., Nuver-Zwart, I. and Van De Putte, L., 1989. Effects of hydroxychloroquine and sulphasalazine on progression of joint damage in rheumatoid arthritis. *The Lancet*, *333*(8646), pp.1036-1038.

Vassallo, P. and Trohman, R.G., 2007. Prescribing amiodarone: an evidence-based review of clinical indications. *Jama*, *298*(11), pp.1312-1322.

Voiculetz, N., Smith, K.C. and Kaplan, H.S., 1974. Effect of quinacrine on survival and DNA repair in X-irradiated Chinese hamster cells. *Cancer research*, *34*(5), pp.1038-1044.

Wallace, D.J., 1989, May. The use of quinacrine (Atabrine) in rheumatic diseases: a reexamination. In *Seminars in arthritis and rheumatism* (Vol. 18, No. 4, pp. 282-296). WB Saunders.

Wiper, A., Roberts, D.H. and Schmitt, M., 2007. Amiodarone-induced skin pigmentation: Q-switched laser therapy, an effective treatment option. *Heart*, *93*(1), p.15.

Xu, K., Yang, Y., Yan, M., Zhan, J., Fu, X. and Zheng, X., 2010. Autophagy plays a protective role in free cholesterol overload-induced death of smooth muscle cells. *Journal of lipid research*, *51*(9), pp.2581-2590.

Yang, T., Snyders, D. and Roden, D.M., 2001. Drug block of I Kr: model systems and relevance to human arrhythmias. *Journal of cardiovascular pharmacology*, *38*(5), pp.737-744.

Yang, W.C.T., Strasser, F.F. and Pomerat, C.M., 1965. Mechanism of drug-induced vacuolization in tissue culture. *Experimental cell research*, *38*(3), pp.495-506.

Yang, Z., Huang, J., Geng, J., Nair, U. and Klionsky, D.J., 2006. Atg22 recycles amino acids to link the degradative and recycling functions of autophagy. *Molecular biology of the cell*, *17*(12), pp.5094-5104.

Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A.J. and Heintz, N., 2003. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(25), pp.15077-15082.

Zhang, Z., Zheng, Y., Mazon, H., Milgrom, E., Kitagawa, N., Kish-Trier, E., Heck, A.J., Kane, P.M. and Wilkens, S., 2008. Structure of the yeast vacuolar ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(51), pp.35983-35995.

Zheng, N., Zhang, X. and Rosania, G.R., 2011. Effect of phospholipidosis on the cellular pharmacokinetics of chloroquine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 336(3), pp.661-671.

Zimmer, S., Grebe, A., Bakke, S.S., Bode, N., Halvorsen, B., Ulas, T., Skjelland, M., De Nardo, D., Labzin, L.I., Kerksiek, A. and Hempel, C., 2016. Cyclodextrin promotes atherosclerosis regression via macrophage reprogramming. *Science translational medicine*, *8*(333), pp.333ra50-333ra50.