

# UNIVERSITÉ BORDEAUX II - VICTOR SÉGALEN

Année 2010

Thèse n° 1794

## THÈSE

pour le

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX II

mention : Sciences, technologie, santé

option : Biochimie

présentée et soutenue publiquement le

16 décembre 2010

par

**Thibaud RENAULT**

**né le 30 décembre 1985 à Thouars**

## Régulations de la protéine proapoptotique Bax rôle des kinases Akt et GSK-3 $\beta$ et de la protéine antiapoptotique Bcl-x<sub>L</sub>

### Membres du jury :

M. Érick DUFOURC, directeur de recherches, CNRS Bordeaux

M. Philippe JUIN, directeur de recherches, INSERM Nantes

M. Jérôme ESTAQUIER, directeur de recherches, INSERM Créteil

Mme. Francesca DE GIORGI, chargée de recherches, INSERM Bordeaux

M. Abdel AOUACHERIA, chargé de recherches, CNRS Lyon

M. Stéphen MANON, chargé de recherches, CNRS Bordeaux

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examinateur

Examinateur

Directeur de Thèse



*À mon frère, Simon.  
À ma famille et mes amis.*

Une civilisation sans la Science, ce  
serait aussi absurde qu'un poisson  
sans bicyclette.

---

Pierre Desproges (1939–1988)  
*Vivons heureux en attendant la mort*



# Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé à l'Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires à Bordeaux au sein de l'équipe *Mitochondries, Stress et Morts Cellulaires* sous la direction du D<sup>r</sup> Stéphen Manon.

En premier lieu, je tiens à remercier les membres du jury, le D<sup>r</sup> Érick Dufourc, le D<sup>r</sup> Philippe Juin, le D<sup>r</sup> Jérôme Estaquier, le D<sup>r</sup> Francesca De Giorgi et le D<sup>r</sup> Abdel Aouacheria d'avoir pris part à l'évaluation de ce travail. Je garderai un très bon souvenir de la discussion passionnante qui a eu lieu lors de la soutenance.

Ces quelques années passées à l'IBGC auront été particulièrement agréables et enrichissantes notamment grâce aux personnes admirables que j'ai eu la chance de côtoyer.

À mon directeur de thèse, Stéphen, un très grand merci ! Merci tout d'abord de m'avoir fait confiance et laissé une liberté très appréciable dans la réalisation de mon travail. Merci de m'avoir fait partager une passion pour la recherche, d'avoir été très présent pour me conseiller. Capitaine d'un équipage d'Amazones au caractère fort, le spectro dans l'œil et le chronomètre au bout des lèvres.

Nadine, merci d'avoir été présente pour me conseiller et répondre à mes questions les innombrables fois où j'avais perdu Stéphen ! Bon courage sur la route ☺

Gisèle, ¡ *muchas gracias* ! pour ta gentillesse et ton soutien sans failles, en particulier au cours de ces longues heures que nous avons passées en chambre froide à préparer des mitochondries. Merci pour le thé salvateur du matin qui m'aura aidé à tenir le coup ! Je te souhaite un repos bien mérité et de profiter de ta famille !

Muriel, merci pour tes précieux conseils, pour les nombreuses discussions, scientifiques ou non, que nous avons eues. Je te suis également très reconnaissant de m'avoir initié au monde de la culture cellulaire.

Florian, je suis très heureux d'avoir fait ta connaissance et d'avoir partagé de très bon moments. J'espère que tu ne vas pas te sentir trop seul désormais parmi toutes ces filles. Je te souhaite toute la réussite que tu ne manqueras pas d'avoir pour la fin de ta thèse !

Je tiens à exprimer toute mon amitié aux personnes que j'ai rencontrées au cours de la vie de l'équipe ; Maïka, Noëlle, Cécile, Xavier, Ingrid, Rui, Dario, Sara, ainsi qu'aux membres des équipes des 4<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> étages que j'ai côtoyés tout au long de ma thèse. En particulier, Patrick<sup>♠</sup>, Johann et Marion (bon courage à vous deux pour la dernière année).

Je remercie Emmanuel pour son aide et ses conseils sur  $\text{\LaTeX}$  lors de la rédaction de cette thèse et Julien pour son aide à la réalisation des images des structures tridimensionnelles de Bax.

# Sommaire

|            |                                                                                                                |            |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>I</b>   | <b>Introduction</b>                                                                                            | <b>3</b>   |
| <b>1</b>   | <b>Morts cellulaires</b>                                                                                       | <b>5</b>   |
| <b>2</b>   | <b>Mécanismes moléculaires des morts cellulaires</b>                                                           | <b>15</b>  |
| <b>3</b>   | <b>La mitochondrie, organe central de la voie intrinsèque de l'apoptose</b>                                    | <b>33</b>  |
| <b>4</b>   | <b>La protéine proapoptotique Bax</b>                                                                          | <b>59</b>  |
|            | <b>Objet de l'étude et stratégie mise en œuvre</b>                                                             | <b>75</b>  |
| <b>II</b>  | <b>Résultats</b>                                                                                               | <b>77</b>  |
| <b>1</b>   | <b>Caractérisation du rôle des kinases Akt et GSK-3<math>\beta</math> sur le processus d'activation de Bax</b> | <b>79</b>  |
| <b>2</b>   | <b>Rôle de la protéine antiapoptotique Bcl-x<sub>L</sub> sur les changements de conformation de Bax</b>        | <b>111</b> |
| <b>3</b>   | <b>Mise en œuvre d'une méthode de criblage</b>                                                                 | <b>133</b> |
| <b>III</b> | <b>Discussion et perspectives</b>                                                                              | <b>139</b> |
|            | <b>Discussion</b>                                                                                              | <b>141</b> |
|            | <b>Perspectives</b>                                                                                            | <b>144</b> |
| <b>IV</b>  | <b>Matériels et Méthodes</b>                                                                                   | <b>151</b> |
| <b>1</b>   | <b>Biologie moléculaire</b>                                                                                    | <b>153</b> |
| <b>2</b>   | <b>Biologie Cellulaire</b>                                                                                     | <b>161</b> |
| <b>3</b>   | <b>Biochimie</b>                                                                                               | <b>165</b> |
| <b>4</b>   | <b>Bioinformatique</b>                                                                                         | <b>171</b> |

## SOMMAIRE

---

|                           |            |
|---------------------------|------------|
| <b>Table des matières</b> | <b>174</b> |
| <b>Table des figures</b>  | <b>180</b> |
| <b>Nomenclature</b>       | <b>185</b> |
| <b>Index</b>              | <b>187</b> |
| <b>Bibliographie</b>      | <b>189</b> |

## **Première partie**

### **Introduction**



# Morts cellulaires

Life's the greatest torture souls feel  
in hell. In hell, that they must live,  
and cannot die.

John Webster (1580–1632)  
*The Duchess of Malfi*

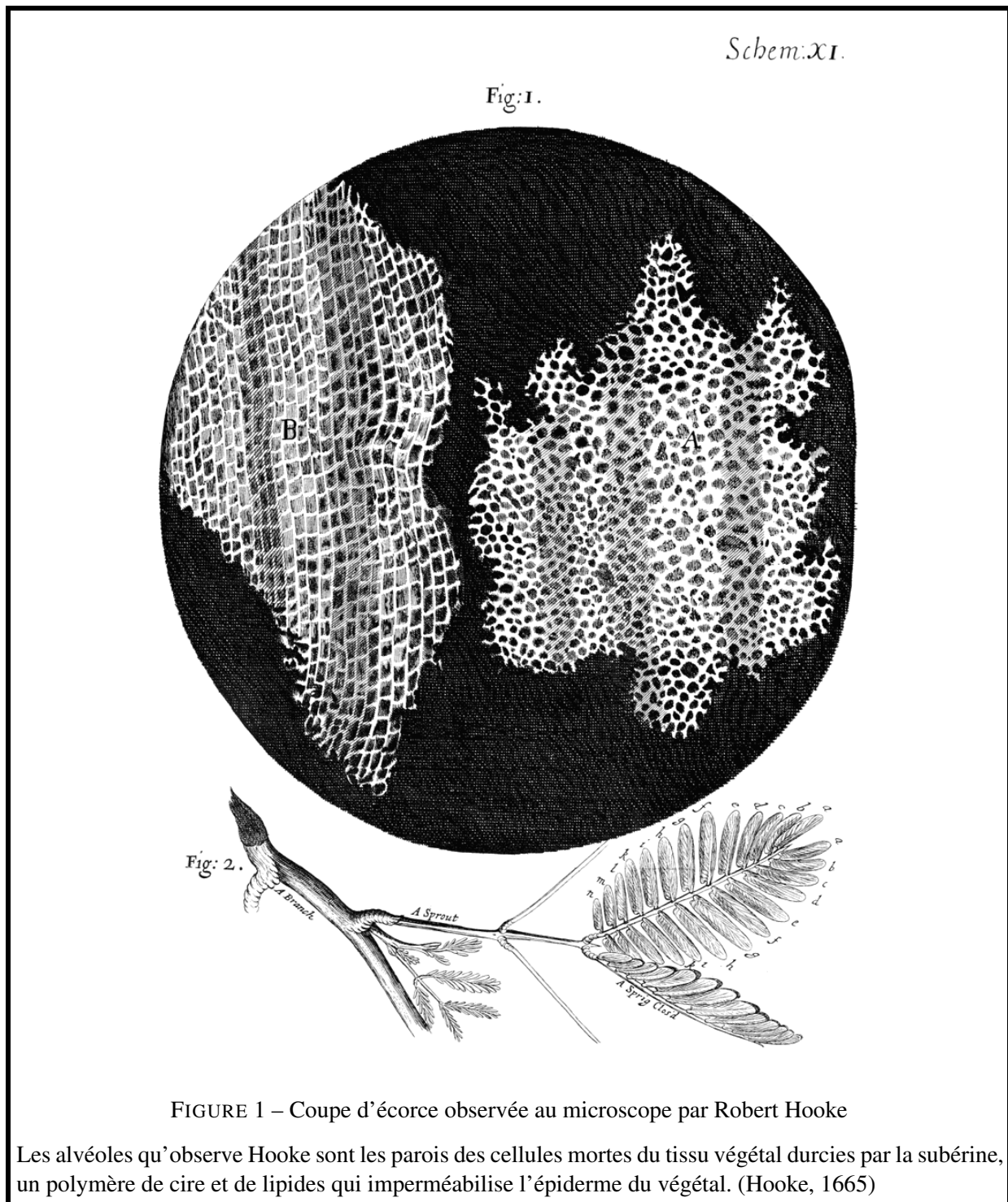
## Sommaire

|     |                                                                               |    |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1   | Pourquoi les cellules meurent-elles ? . . . . .                               | 5  |
| 1.1 | Rôle lors du développement . . . . .                                          | 7  |
| 1.2 | Maintien de l'homéostasie . . . . .                                           | 8  |
| 1.3 | Réponse à un stress . . . . .                                                 | 9  |
| 2   | Principaux phénotypes et morphologies de morts cellulaires . . . . .          | 9  |
| 2.1 | L'apoptose . . . . .                                                          | 9  |
| 2.2 | La mort avec autophagie . . . . .                                             | 11 |
| 2.3 | La nécrose . . . . .                                                          | 12 |
| 2.4 | Autres formes de morts cellulaires . . . . .                                  | 13 |
| 3   | Implications pathologiques d'une dérégulation des morts cellulaires . . . . . | 14 |

## 1 Pourquoi les cellules meurent-elles ?

En 1665, le physicien Robert Hooke décrit pour la première fois des cellules en observant au microscope une coupe de liège (suber). Il donne le nom de cellule aux fines alvéoles composant le tissu végétal en analogie avec la cellule dans laquelle s'isolent et vivent les moines. Ce qu'observe Hooke n'est en réalité que la paroi durcie de polymères de lipides et de cire de ce que nous appelons aujourd'hui une cellule (Figure 1). Les cellules se sont différenciées puis sont mortes. Cette étape aura permis la constitution d'une couche protectrice imperméable.

En 1838 et 1839, les travaux de Schleiden et Schwann apportent la vision d'une cellule en tant que brique élémentaire d'un organisme. Au cours du 19<sup>ème</sup> siècle allaient être découvertes les principales caractéristiques morphologiques et les composants internes d'une cellule.



En 1842, Carl Vogt étudie la métamorphose du crapaud accoucheur *Alytes obstetricans* et observe que certaines cellules meurent au cours du processus. En 1964 Williams et Lockshin introduisent le concept de mort cellulaire programmée en corrélant le déclenchement de la mort cellulaire et une régulation endocrine lors du développement chez le ver à soie. En 1972, 130 ans après les observations de Vogt, Kerr, Wyllie et Curie décrivent l'ultrastructure de différents types cellulaires chez le rat et mettent

en évidence les premières caractéristiques morphologiques de l'apoptose (Kerr *et al.*, 1972). Ils considèrent immédiatement ce processus comme un moyen pour l'organisme de contrecarrer la mitose dans le contrôle des populations cellulaires. John Sulston découvre en 1976 que 131 des 1090 cellules du ver *Cænorhabditis elegans* meurent lors de son développement (Sulston, 1976). Horvitz identifie en 1983 les principaux gènes contrôlant ce processus et démontre ainsi l'existence d'une régulation génétique d'un programme de mort (Horvitz *et al.*, 1983).

Klement met en évidence en 1964 la relation entre l'infection de feuilles de tabac par le pathogène *Pseudomonas syringae* et la mort des tissus environnants par une nécrose rapide et localisée. C'est la réponse hypersensible. Ce phénomène permet à la plante de contrôler l'infection et d'empêcher la dissémination du pathogène en isolant les zones contaminées (Lovrekovich *et al.*, 1964).

Le fait que la mort d'une cellule soit un phénomène régulé et même programmé est ainsi progressivement devenu un événement incontournable et son étude l'un des thèmes de recherche les plus prolifiques de la biologie des 20<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> siècles. Cette première partie présente, à travers un historique des travaux du domaine, les principaux rôles des formes majeures de mort cellulaire, leurs phénotypes ainsi qu'une brève ouverture sur les pathologies associées à une dérégulation de ces morts.

### 1.1 Rôle lors du développement

Chez les organismes pluricellulaires, la mort cellulaire programmée joue un rôle fondamental lors du développement. Ainsi, lors de la mise en place du système nerveux, une quantité excessive de neurones est produite dont la moitié sera éliminée par un processus de mort cellulaire programmée (Hamburger et Levi-Montalcini, 1949). Cette découverte datant de la fin des années 40 a bousculé l'idée selon laquelle le développement est restreint à un ensemble de processus constructifs. Des exemples de pertes d'organes dues à une mort massive de cellules étaient déjà connus (dégénérescence de la queue lors de la métamorphose du têtard) mais il paraissait improbable qu'un tel phénomène puisse se produire, par exemple, lors de la neurogénèse étant donné le coût énergétique occasionné. La dépense énergétique engendrée reste cependant bien inférieure à ce qu'elle pourrait être si l'organisation entre les neurones ne résultait pas d'un processus de sélection *in situ* des neurones correctement intégrés au réseau mais si cette information devait être génétique. Ici seuls les neurones ayant établi des connexions au réseau neuronal recevront les signaux de survie indispensables à leur maintien. Les neurones incapables de former ces communications mourront.

D'une manière générale, le modelage des organes à la forme complexe implique une mort massive de cellules. Lors de la formation des néphrons dans le rein, la dégénérescence de certaines cellules du mésoderme permet de sculpter leur forme étroitement liée à leur fonction. Lors de la différenciation sexuelle de l'embryon et selon son caryotype, les canaux de Müller (embryons XY) ou de Woff (embryons XX) seront éliminés entre la 6<sup>ème</sup> et la 10<sup>ème</sup> semaine du développement alors que les deux sont formés dans les stades initiaux du développement.

Un dernier exemple bien connu est la mort du tissu interdigital, chez l'homme, lors de la 16<sup>ème</sup> semaine de gestation. Ce tissu embryonnaire résulte de la transition entre la forme palette de la main et l'individualisation des doigts. Un défaut de mort cellulaire est la cause de syndactylies. Chez certaines espèces telles que les anatidés (canards, oies, etc.) ou les chiroptères (chauves-souris) la mort des tissus

interdigitaux est inhibée, ce qui entraîne la formation de palmes ou d'ailes (Figure 2) (Zou et Niswander, 1996; Weatherbee *et al.*, 2006).

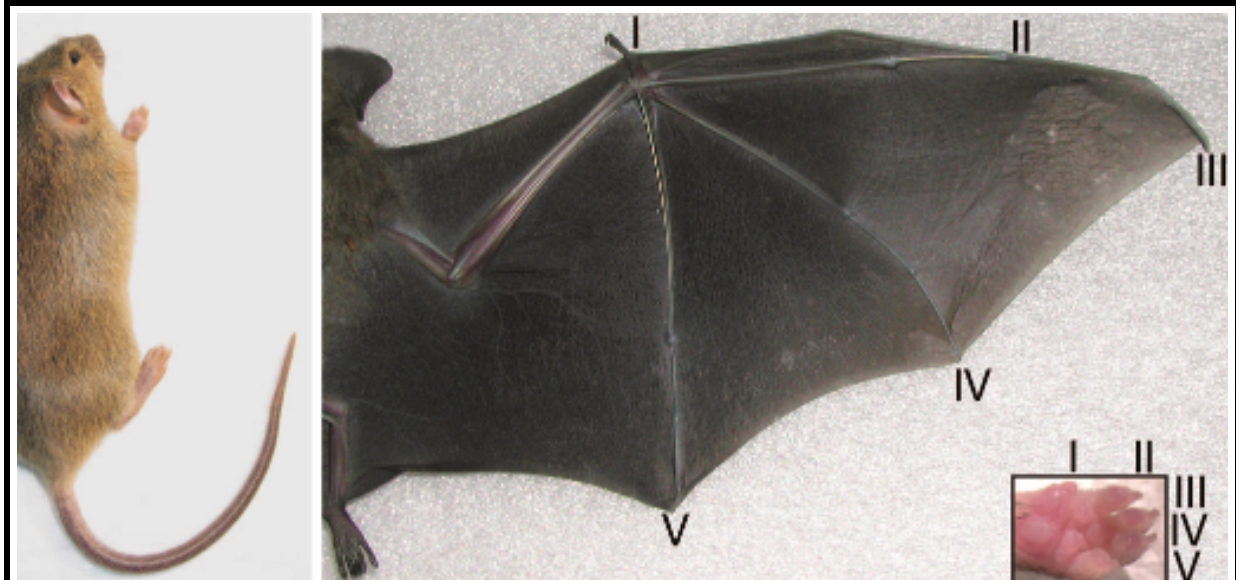


FIGURE 2 – Comparaison du tissu interdigital chez la souris et la chauve-souris

(A et encadré) Lors du développement embryonnaire de la souris le tissu interdigital meurt par apoptose et est absent au stade adulte.

(B) Chez la chauve-souris cette mort est inhibée par les gènes Gremlin et Fgf8 et conduit au maintien du tissu interdigital au stade adulte.

La position des doigts est numérotée de I (antérieur) à V (postérieur)

(Weatherbee *et al.*, 2006)

## 1.2 Maintien de l'homéostasie

La mort cellulaire joue non seulement un rôle primordial lors du développement, mais elle est également indispensable au maintien de l'homéostasie de l'organisme.

Les lymphocytes T sont des cellules du système immunitaire impliquées dans la voie cellulaire de la réponse immunitaire. Lorsqu'une cellule est infectée par un agent pathogène elle devient un lieu propice à sa reproduction et ainsi un danger pour l'organisme. Ces cellules infectées peuvent présenter sur leur surface des marqueurs antigéniques couplés aux protéines du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Elles seront alors reconnues par les lymphocytes T cytotoxiques (CD8+) qui, activés par ce contact, libéreront des molécules toxiques ou cytolytiques (perforine, granzyme) qui conduiront à la mort des cellules infectées.

Cette capacité des lymphocytes T cytotoxiques à déclencher la mort doit être elle-même étroitement contrôlée par l'organisme. Ainsi, lors de la genèse des thymocytes (précurseurs des lymphocytes T), plusieurs étapes de sélection conduisent à l'élimination de 98% des cellules candidates. Durant l'étape de sélection positive, les thymocytes sont soumis à un contact avec les protéines du CMH. Seules les cellules exprimant des récepteurs à forte affinité pour les protéines du CMH seront sélectionnées. Les

survivantes subissent une étape de sélection négative. Au contact d'antigènes du soi, les thymocytes capables d'induire une auto-immunité recevront un signal de mort conduisant à leur élimination. Un défaut lors de ces étapes de sélection peut conduire à la production de lymphocytes dirigés contre le soi (maladies auto-immunes) ou dont la capacité proliférative peut être source de cancérisation (lymphomes).

Après la fin de l'allaitement, les glandes mammaires des mammifères, qui avaient acquis un volume adapté à l'activité de production de lait, ont un retour à une taille normale. Cette diminution de volume s'accompagne d'une mort massive de cellules du tissu épithélial sécréteur et de cellules du tissu endothélial des capillaires sanguins (Motyl *et al.*, 2006; Fadok, 1999).

Certains tissus doivent être renouvelés très régulièrement. Ainsi, l'épithélium intestinal est soumis à d'importantes contraintes mécaniques et à un environnement particulièrement peu favorable (présence de toxines, de pathogènes). On estime que cet épithélium est régénéré tous les 3 à 5 jours, ce qui implique une prolifération cellulaire du côté basal de l'épithélium, et parallèlement une mort cellulaire côté lumen, exacerbées.

### 1.3 Réponse à un stress

Au delà de leur environnement physiologique, les cellules peuvent être soumises à des conditions extrêmes pour lesquelles une adaptation métabolique n'est pas suffisante à maintenir leur survie. Il existe dans ces conditions des mécanismes d'éviction des cellules touchées. Face à des conditions de température élevée, à une présence de xénobiotiques, de rayonnements (UV, radioactivité), une cellule possède des mécanismes d'adaptation ou de restauration (réparation de l'ADN, protéines chaperons, etc.). Ces mécanismes font intervenir des protéines spécifiques souvent en lien étroit avec les processus de mort cellulaire. Par exemple les protéines Hsp27 et Hsp70 sont exprimées lorsque la cellule est soumise à un stress thermique, oxydant ou à des métaux lourds. Elles ont alors un double rôle. Tout d'abord elles participent aux voies de survie cellulaire grâce à leur activité chaperon. En parallèle, elles interviennent comme inhibiteurs des mécanismes de mort cellulaire programmée notamment *via* la voie PI3K/Akt et Bax (Havasi *et al.*, 2008) en bloquant le relargage du cytochrome c (Bruey *et al.*, 2000) de Smac/DIABLO (Chauhan *et al.*, 2003) et l'activation des caspases 3 et 7 (Komarova *et al.*, 2004). Cette inhibition est en revanche dépendante de l'intensité du stress et il a été montré que pour des températures très élevées, Hsp27 n'était plus exprimée et restaurait l'activation de la caspase 3 (Samali *et al.*, 1999). D'une manière générale, lorsque la cellule est incapable de déclencher des mécanismes de survie (par exemple, lorsque la voie Hsp est inhibée) la mise en place d'un processus de mort programmée se substitue à la survie et permet d'éliminer les cellules impliquées (Gorman *et al.*, 1999).

## 2 Principaux phénotypes et morphologies de morts cellulaires

### 2.1 L'apoptose

Les premiers événements à avoir été décrits lors des travaux à l'origine de la caractérisation de l'apoptose sont des événements se déroulant dans les phases tardives du processus. L'apoptose a été définie sur la base de critères morphologiques par Kerr, Wyllie et Curie en 1972 (Kerr *et al.*, 1972). Ces

auteurs observent les cellules de tissus embryonnaires, adultes et tumoraux et mettent en évidence un certain nombre de caractéristiques suggérant une forme de mort cellulaire programmée. Tout d'abord les cellules mourantes subissent une réduction de leur volume cytosolique et nucléaire (pyknose). S'ensuit une fragmentation du noyau (karyorrhexis) et de la cellule qui conduit à la formation de petits corps (les corps apoptotiques) dont l'intégrité membranaire est parfaitement conservée (Figure 3). Ces corps sont finalement phagocytés par des cellules environnantes. C'est cette morphologie évoquant le détachement des pétales d'une fleur ou des feuilles d'un arbre qui a conduit au choix du terme grec *ἀπόπτωσις* (apoptosis) décrivant ce phénomène.

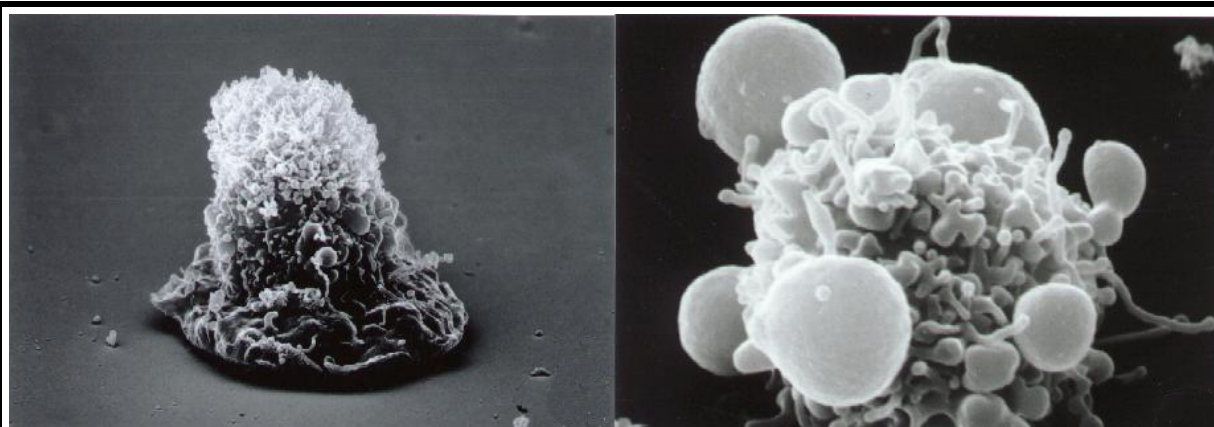


FIGURE 3 – Morphologie de cellules épithéliales lors de deux stades de l'apoptose

Morphologie de cellules apoptotiques observées en microscopie électronique à balayage.

Cliché de gauche : lors des stades précoces la cellule subit une réduction de son volume.

Cliché de droite : lors des stades tardifs la cellule bourgeonne pour former des corps apoptotiques. Ces corps contenant des débris cellulaires seront éliminés par des macrophages.

(clichés de microscopie : Walter Malorni, Stefano Fais et Carla Fiorentini)

En 1980 Wyllie étudie l'activation de nucléases au cours du processus apoptotique et montre que les chromosomes sont digérés en larges fragments de 30-50 et 200-300 kpb. Cette digestion est suivie d'un clivage inter-nucléosomal conduisant à un phénotype « en échelle » lorsque qu'une préparation d'ADN génomique de cellules apoptotiques est analysée par électrophorèse sur gel d'agarose. La taille des fragments observés correspond à des multiples de la taille de l'ADN enroulé autour des nucléosomes (Wyllie, 1980). Cette dégradation de l'ADN sera à l'origine de la mise au point en 1992 par Gavrieli d'une technique de coloration des noyaux des cellules mourantes. Basée sur la fixation par une ADN désoxynucléotidyltransférase de dUTP couplé à un marqueur fluorescent sur l'extrémité 3' libre de l'ADN, la technique de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) permet un marquage des cellules d'autant plus intense que l'ADN est fragmenté (Gavrieli *et al.*, 1992). Elle ne permet cependant pas de discriminer l'apoptose d'autres formes de morts cellulaires accompagnées de dégradation de l'ADN.

Savill et ses collaborateurs mettent en évidence en 1989 le rôle des macrophages dans l'élimination du danger cytotoxique représenté par des neutrophiles sénescents engagés dans un processus de mort

cellulaire programmée. Ces observations confirmées par d'autres groupes mettent l'accent sur une des facettes majeures de l'apoptose : un processus de mort se déroulant sans déclenchement des voies d'inflammation (Savill *et al.*, 1989). Fadok explicite trois ans plus tard les mécanismes de reconnaissance des cellules apoptotiques par les macrophages. Ces cellules exposent un phospholipide du feuillet interne de la membrane plasmique, la phosphatidylsérine, sur le feuillet externe. La reconnaissance des phosphatidylsérines par les macrophages est spécifique car inhibée par la présence de liposomes contenant des phosphatidyl-L-sérines ou des analogues structuraux mais pas par d'autres phospholipides (Fadok *et al.*, 1992). Cette propriété sera utilisée par la suite comme un test caractérisant les cellules apoptotiques. Utilisant l'affinité de l'Annexine V pour les phosphatidylsérines, il est possible grâce à de l'Annexine V couplée au FITC (fluorescéine isothiocyanate) de marquer spécifiquement les cellules exposant ces lipides sur le feuillet externe de la membrane plasmique (Koopman *et al.*, 1994).

## 2.2 La mort avec autophagie

### 2.2.1 L'autophagie, un programme de survie cellulaire

En 1962, dix ans avant la description de l'apoptose, Ashford et Potter réalisent des clichés de microscopie électronique à partir d'échantillons de foie de rat. Lorsque le foie a été perfusé avec du glucagon, une hormone pancréatique hyperglycémisante, des zones denses aux électrons similaires à des lysosomes apparaissent. La taille anormalement importante de ces vésicules et l'inclusion de portions de cytoplasme laisse présager la présence d'un nouveau type de structure, les autophagosomes (Ashford et Porter, 1962). Deter et De Duve caractérisent en 1967 l'activité protéasique de ces vésicules due à des protéases lysosomiales (Deter et Duve, 1967). En 1969, Ericsson apporte à la compréhension des mécanismes impliqués en observant la formation de doubles membranes séquestrant des portions de cytoplasme qui sont à l'origine des autophagosomes (Ericsson, 1969). En 1990, le mécanisme d'activation des autophagosomes est mis en évidence par microscopie électronique : l'acquisition des propriétés lytiques découle de leur fusion avec des lysosomes et conduit à la formation de vésicules nommées des autophagolysosomes.

Par ce mécanisme de séquestration, l'autophagie permet la dégradation de constituants cellulaires (Figure 4). Ce phénomène est à l'origine de plusieurs fonctions cellulaires impliquées dans des mécanismes du développement, de maintien de l'homéostasie ou de survie. Ainsi l'autophagie est requise lors du développement neuronal (Hara *et al.*, 2006), contribue au maintien d'un état physiologique stable en assurant l'apport en nutriment lors de carences (Klionsky 2003), participe à l'élimination de corps étrangers à la cellule tels que des bactéries (Kobayashi *et al.*, 2001) ou encore à la lutte contre le vieillissement cellulaire (Doelling *et al.*, 2002).

### 2.2.2 L'autophagie et la mort cellulaire

Le déclenchement de la mort dans des cellules de carcinome mammaire semble dépendant de l'autophagie. D'un point de vue morphologique, la mort est accompagnée de la formation de vésicules. Le processus de mort est aboli par l'ajout d'un inhibiteur de l'autophagie, la 3-méthyladénine (Bursch *et al.*, 1996).

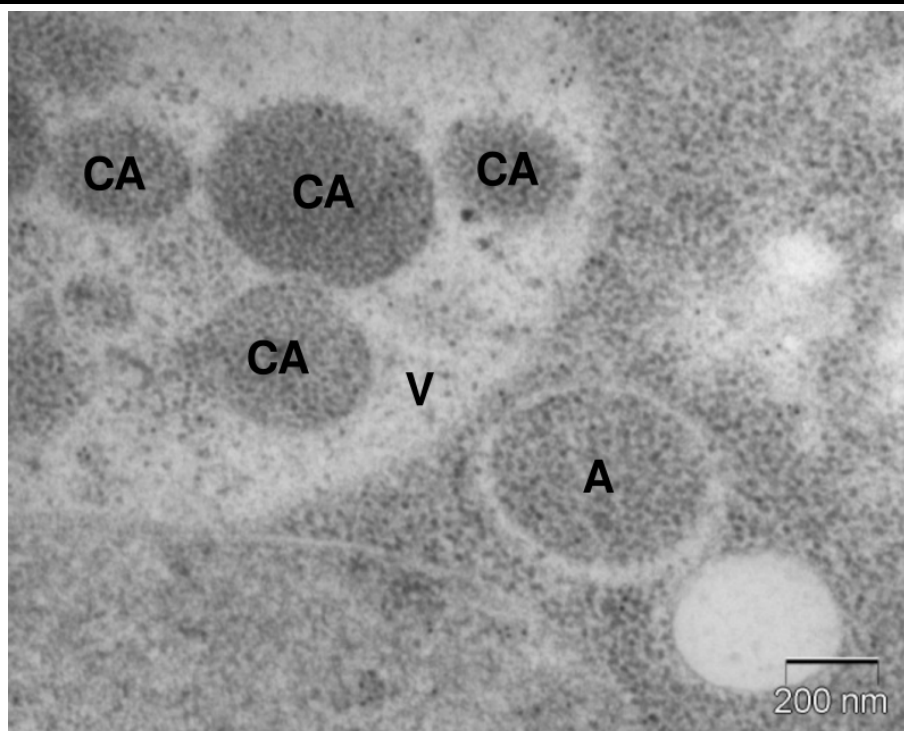


FIGURE 4 – Morphologie de l'autophagie chez *Saccharomyces cerevisiae*

Morphologie d'une cellule autophagique en microscopie électronique à transmission.

L'autophagie a été déclenchée par une carence azotée de 3h en milieu glucose. Les clichés sont réalisés en présence d'un inhibiteur de protéases (PMSF) afin d'éviter la dégradation des corps autophagiques dans la vacuole. Une portion de cytoplasme est séquestrée par une double membrane lipidique pour former un autophagosome (A) qui peut fusionner avec la vacuole (V). Une fois intégrés dans la vacuole, les corps autophagiques (CA) sont dégradés.

(cliché de microscopie : Nadine Camougrand et Bénédicte Salin)

Il semble que lorsque l'apoptose est inhibée, les cellules sont capables de mourir par un mécanisme indépendant des caspases et dépendant de l'autophagie (Xu *et al.*, 2006). Il existe certains acteurs communs aux deux processus qui pourraient participer à une signalisation croisée, par exemple la protéine Beclin-1 qui possède un domaine BH3 et peut interagir avec la protéine antiapoptotique Bcl-2 (Pattingre *et al.*, 2005).

À ce jour les mécanismes sous-jacents à ces observations sont inconnus. Il n'est par exemple pas défini si l'autophagie, grâce à sa machinerie de séquestration et de dégradation, constitue en soi un processus de mort, si ces événements participent à une signalisation et que la mort est déclenchée par d'autres acteurs ou encore si l'autophagie est un mécanisme déclenché pour contrer la mort des cellules.

## 2.3 La nécrose

Historiquement, la nécrose fut le premier type de mort à avoir été décrit. La nécrose considérée d'un point de vue tissulaire peut présenter des formes variées (liquéfaction des tissus, coagulation des protéines, formation de matières fibreuses...). D'un point de vue cellulaire, elle est caractérisée par un

gonflement de la cellule et des organites, un changement de morphologie nucléaire accompagné d'une dégradation de l'ADN et par la perte d'intégrité de la membrane plasmique (Figure 5). La libération du contenu cellulaire consécutive à la rupture de la membrane plasmique est responsable du déclenchement d'un processus d'inflammation et de la propagation des dommages aux cellules environnantes. Dans certains cas une partie des débris cellulaires peut être éliminée par les macrophages par macropinocytose (Krysko *et al.*, 2006).

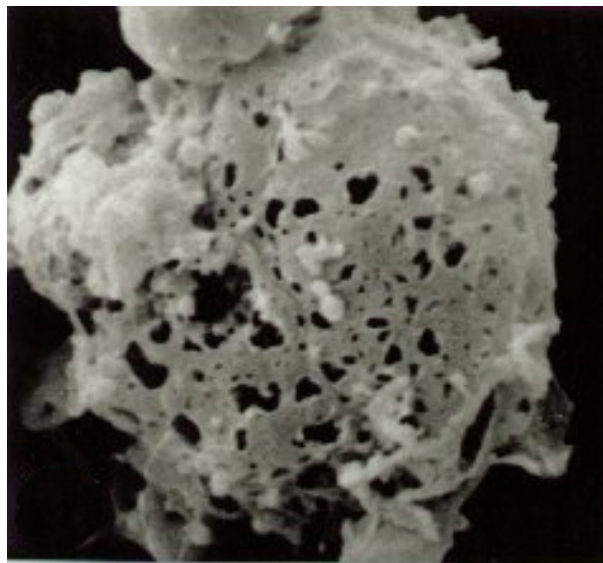


FIGURE 5 – Morphologie d'une cellule nécrotique

Cette cellule nécrotique observée en microscopie électronique à balayage présente une caractéristique typique de la nécrose. La cellule a perdu son intégrité membranaire. La membrane plasmique est perméabilisée entraînant la libération de facteurs nécrotiques dans le milieu extracellulaire et le déclenchement d'une réaction d'inflammation.

(cliché de microscopie : Marco Vitale, Giorgio Zauli et Elisabetta Falcieri)

### 2.4 Autres formes de morts cellulaires

Il existe de nombreuses autres formes de mort présentant des spécificités morphologiques ou moléculaires (Kroemer *et al.*, 2009). La cornification, ou kératinisation, est le processus de différenciation et de mort des cellules du tissu épithélial, les cellules accumulent des protéines spécifiques telles que la kératine et des lipides, perdent leur noyau et meurent en formant une couche protectrice. L'anoïkose est un cas particulier d'apoptose. Cette mort est déclenchée lorsque les cellules perdent contact avec la matrice extracellulaire et activent une signalisation par les récepteurs d'adhésion cellulaire. L'excitotoxicité est un type de mort neuronale déclenchée par une hyperactivation des récepteurs au glutamate et à ses analogues. Elle partage des caractéristiques moléculaires et morphologiques avec l'apoptose et la nécrose.

Excepté pour la cornification qui présente des caractéristiques moléculaires et morphologiques originales, la considération de ces morts comme des processus réellement différents des trois principaux types de mort cellulaire est encore soumis à débat.

### 3 Implications pathologiques d'une dérégulation des morts cellulaires

La mort cellulaire intervient dans de très nombreux mécanismes physiologiques. Ainsi, une dérégulation de ce processus peut entraîner un panel important de pathologies. La mort contrebalance généralement la prolifération cellulaire. Une des premières causes de pathologies est un déséquilibre entre les deux phénomènes. Un défaut d'apoptose conduit à l'accumulation de cellules dans un tissu. Lors du développement une déficience des morts cellulaires peut affecter la mise en place de certains organes et conduire à des malformations. Au cours de la vie, la non-élimination de cellules ayant accumulé des dommages et leur prolifération incontrôlée peut conduire à la formation de tumeurs. À l'inverse un excès de mort cellulaire peut être la cause de maladies dégénératives telles que les maladies d'Alzheimer, de Parkinson, d'Huntington ou de la sclérose latérale amyotrophique (Zhivotovsky et Orrenius, 2010).

Un certain nombre de maladies auto-immunes a pour origine un trouble du processus apoptotique. Par exemple le lupus érythémateux disséminé peut être déclenché par un excès d'apoptose associé à un défaut d'élimination des corps apoptotiques issus de monocytes lors de la phase de sélection négative. La présence de débris cellulaires porteurs d'antigènes du soi conduit à la production d'anticorps dirigés contre l'organisme. La polyarthrite rhumatoïde résulte d'un défaut d'apoptose des cellules synoviales combiné au déclenchement d'un processus inflammatoire. La prolifération de lymphocytes et l'amplification de l'inflammation résultent en une altération osseuse et cartilagineuse.

Les affections virales peuvent également causer leur effets délétères *via* une dérégulation de l'apoptose. Un cas bien connu est celui du VIH qui peut être responsable d'une perte de l'immunité par destruction des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Petit *et al.*, 2003).

Ce chapitre a montré que les morts cellulaires interviennent dans de nombreux processus physiologiques et qu'elles sont indispensables à la survie et au maintien d'un organisme. Le bon déroulement de ces morts suppose des mécanismes spécifiques et régulés. La prochaine partie détaille les mécanismes moléculaires de deux principaux types de mort : la nécrose et l'apoptose.

# Mécanismes moléculaires des morts cellulaires

Of all escape mechanisms, death is the most efficient.

Henry Ward Beecher (1813–1887)

## Sommaire

|     |                                                         |           |
|-----|---------------------------------------------------------|-----------|
| 1   | Mécanismes moléculaires de la nécrose . . . . .         | <b>15</b> |
| 1.1 | Signaux inducteurs de la nécrose . . . . .              | 16        |
| 1.2 | Acteurs et mécanismes moléculaires . . . . .            | 17        |
| 2   | Mécanismes moléculaires de l'apoptose . . . . .         | <b>18</b> |
| 2.1 | L'apoptose chez <i>Caenorhabditis elegans</i> . . . . . | 18        |
| 2.2 | L'apoptose chez les mammifères . . . . .                | 20        |

Cette seconde partie a pour objectif de présenter les mécanismes moléculaires généraux de la nécrose et de l'apoptose, notamment les signaux inducteurs de ces morts, les principaux acteurs impliqués et le déroulement de leurs étapes moléculaires majeures. Les éléments concernant la voie intrinsèque de l'apoptose seront abordés plus en détail dans la troisième partie de cette introduction.

## 1 Mécanismes moléculaires de la nécrose

D'un point de vue moléculaire, la nécrose, ou programme cellulaire de type III, a initialement été définie par défaut comme l'ensemble des morts ne correspondant ni à de l'apoptose, ni à de la mort avec autophagie. Elle incluait ainsi principalement des événements accidentels et non régulés. Cependant cette vision restrictive a évolué et, au fil du temps, il est apparu qu'un certain nombre de mécanismes régule le déclenchement et le déroulement de la nécrose.

## 1.1 Signaux inducteurs de la nécrose

Les signaux pouvant déclencher la mort par nécrose sont principalement des événements sévères pouvant être d'origines très variées. Pour la plupart, le facteur déclenchant sera un dommage fort à la cellule ou une dérégulation de voies cellulaires critiques (système immunitaire, production d'énergie...). Généralement ces atteintes sont des événements sortant la cellule des limites de l'intervalle de tolérance aux changements de ses conditions physiologiques. Cependant, comme le détaille le dernier point de cette liste de signaux inducteurs, la nécrose peut faire partie intégrante de processus cellulaires physiologiques.

### 1.1.1 Agents chimiques

Des agents chimiques tels que des molécules (pesticides, poisons, venins) ou des éléments toxiques (métaux lourds) peuvent entraîner des perturbations profondes du fonctionnement cellulaire ou des altérations irréversibles de l'intégrité cellulaire.

### 1.1.2 Agents physiques

Les rayonnements ionisants (rayons X,  $\gamma$ , particules  $\alpha$ ,  $\beta$ ...) d'une dose supérieure à 200 mSv ou des expositions répétées engendrent des brûlures et des dommages cellulaires (ADN, membranes biologiques...) pouvant conduire à la nécrose des tissus touchés.

### 1.1.3 Agents pathogènes

Certaines bactéries sont responsables de fasciites nécrosantes (*Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*...) en libérant lors de l'infection des toxines lytiques ou activatrices des voies d'inflammation et de réponse immunitaire (activation exacerbée des lymphocytes T, surproduction de cytokines...). De même certains virus (*Flaviviridae* *hepacivirus*, *Birnaviridae* *aquabirnavirus*) entraînent le déclenchement de la nécrose en dérégulant le système immunitaire (lymphocytes T) et en inhibant l'apoptose.

### 1.1.4 Conditions cellulaires extrêmes

Des conditions de température extrêmes peuvent engendrer une altération de l'intégrité des cellules. Une hypothermie sévère peut être responsable de la formation de cristaux dans les cellules, affectant leur intégrité. La diminution de la viscosité du sang et la formation de petit caillots peuvent induire une hypoxie. Une hyperthermie quant à elle sera responsable d'une diminution de la stabilité des membranes biologiques, de la dénaturation ou de la coagulation de protéines.

Un défaut (hypoxie) ou une absence (anoxie) d'oxygénation peuvent entraîner la perte de fonctions physiologiques essentielles et une altération des constituants cellulaires. Un exemple bien connu est celui de l'ischémie. Un défaut d'oxygénation d'un organe entraîne un arrêt de la synthèse d'ATP, une perte d'intégrité des membranes cellulaires et une signalisation calcique activatrice de la nécrose. La cellule résiste dans un premier temps à la mort par un métabolisme anaérobie. Le déclenchement de la nécrose est favorisé par la ré-oxygénation de l'organe (reperfusion) (Lemasters *et al.*, 1997).

La déficience en certains nutriments indispensables est également un facteur pouvant déclencher la nécrose. Par exemple une carence en vitamine C (acide ascorbique) induit une production d'espèces activées de l'oxygène lors de l'hydroxylation du collagène entraînant sa dégradation ainsi que celle des capillaires sanguins environnants. L'ensemble de ces atteintes est responsable de nécroses au niveau des muqueuses.

### 1.1.5 Conditions physiologiques

Les signaux présentés précédemment engendrent principalement des atteintes sévères et souvent d'origine externe à l'organisme. Il s'avère que la nécrose peut également être déclenchée par des signaux physiologiques.

Au cours du développement, la différenciation des chondrocytes s'accompagne d'une mort présentant les caractéristiques de la nécrose (Roach et Clarke, 2000). Au cours du renouvellement de l'épithélium intestinal, apoptose et nécrose sont toutes deux impliquées, cependant dans des zones différentes. Ainsi dans l'épithélium des cryptes de Lieberkühn, les cellules coliques semblent mourir préférentiellement par nécrose (Barkla et Gibson, 1999).

La nécrose peut également être considérée comme un mécanisme de secours lors d'un défaut de mise en place de l'apoptose. Ainsi, au cours du développement, l'inhibition des caspases empêche la mort par apoptose des cellules interdigitales. Dans ces conditions un processus nécrotique indépendant des caspases prend le relai et conduit à l'élimination de ces cellules (Chautan *et al.*, 1999). De même l'induction des voies de signalisation des récepteurs de mort en présence d'inhibiteurs de caspases conduit à une mort nécrotique (Holler *et al.*, 2000; Denecker *et al.*, 2001).

## 1.2 Acteurs et mécanismes moléculaires

En comparaison de l'apoptose, les étapes précédant le déclenchement la mort sont moins complexes. Le nombre d'acteurs moléculaires impliqués directement est plus réduit (notamment au niveau des mécanismes de régulation) et bien que le processus soit régulé certains signaux transducteurs majeurs de la nécrose (comme la concentration calcique) sont relativement peu spécifiques.

### 1.2.1 Protéases impliquées dans l'exécution de la nécrose

Deux familles de protéases caractéristiques sont impliquées dans l'exécution du processus nécrotique.

**1.2.1.1 Les calpaïnes, des protéases dépendantes du calcium** Les calpaïnes sont des protéases à cystéine actives principalement à pH neutre. Elles sont activées à des concentrations calciques micromolaires à millimolaires.

Les substrats des calpaïnes sont variés et comprennent des protéines du cytosquelette (actine, spectrine), des kinases (PKC, CDK), des protéines du système immunitaire et de l'inflammation (interleukine-1 $\alpha$ ), de structure et maintien de l'ADN (histones, PARP), du métabolisme (hémoglobine)...

Le clivage de l'échangeur membranaire sodium/calcium, responsable de l'externalisation du calcium, par les calpaïnes est à l'origine de l'augmentation de la concentration calcique cellulaire et à l'amplification du signal nécrotique.

Les calpaïnes sont également responsables du clivage de protéines impliquées dans de l'apoptose (caspases 3, 7, 9, p53, Bid, Bax). Cette propriété est un des indices qui indiquent que les morts apoptotique et nécrotique ne sont pas des phénomènes disjoints et qu'il existe des passerelles entre les deux morts.

**1.2.1.2 Les cathepsines lysosomales** Les lysosomes sont des compartiments acides des cellules animales impliqués dans la dégradation de constituants cellulaires. Ils sont générés lors de la phagocytose ou l'endocytose. Ces organelles sont également impliqués dans les phases tardives de l'autophagie. Ce sont des réservoirs d'hydrolases acides et le pH lysosomal est maintenu à 4,8 par un transport de proton depuis le cytosol grâce à l'ATPase vacuolaire. L'intégrité de cette membrane assure à la fois le fonctionnement des lysosomes et la protection de la cellule contre une libération massive de protons (acidification) et des cathepsines lysosomales.

Au cours de la nécrose, la rupture de la membrane lysosomale consécutive à l'action des calpaïnes et d'espèces activées de l'oxygène sur ses constituants protéiques (ATPase, HSP70) et lipidiques (peroxydation des acides gras) induit l'acidification du cytosol et la libération des cathepsines (Yamashima et Oikawa, 2009).

Les cathepsines lysosomales sont des protéases à aspartate (cathepsine D) ou à cystéine (cathepsines B, H et L). Leurs substrats sont des protéines cellulaires essentielles (collagène, fibrinogène, myéline, histones, hémoglobuline, myoglobine, interleukines, PARP...).

Les cathepsines peuvent également participer à l'activation de protéines régulatrices de l'apoptose en participant par exemple au clivage de Bid (Cirman *et al.*, 2004).

## 1.2.2 Mécanismes généraux

Les mécanismes généraux de la nécrose sont représentés dans la figure 6.

# 2 Mécanismes moléculaires de l'apoptose

## 2.1 L'apoptose chez *Caenorhabditis elegans*

En 1983, Horvitz décrit les principaux gènes responsables de la détermination du devenir des 1090 cellules de *C. elegans*, dont 131 sont amenées à disparaître au cours du développement embryonnaire (Horvitz *et al.*, 1983). Les cellules apoptotiques subissent des changements morphologiques identiques à ceux décrits par Kerr, Wyllie et Curie, jusqu'à l'élimination des débris par phagocytose par une cellule voisine (Kerr *et al.*, 1972).

Parmi les gènes découverts, quatre sont impliqués dans une voie qui sera à l'origine de la compréhension des mécanismes de mort par apoptose. Le gène Ced-3 est une caspase, une protéase qui participe à l'exécution du programme de mort. Seule, Ced-3 est inactive et doit être activée par une protéine : Ced-4,

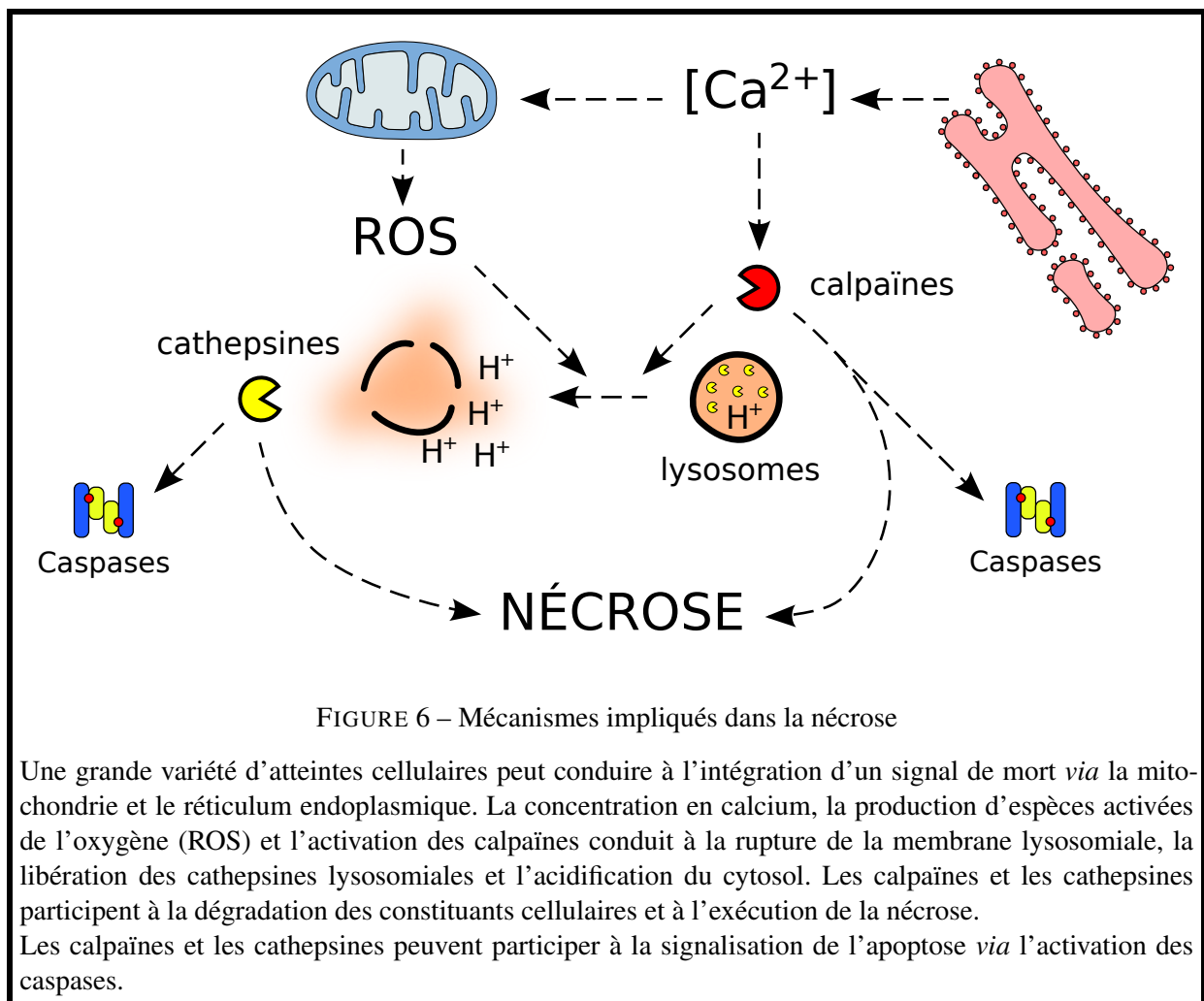


FIGURE 6 – Mécanismes impliqués dans la nécrose

Une grande variété d'atteintes cellulaires peut conduire à l'intégration d'un signal de mort *via* la mitochondrie et le réticulum endoplasmique. La concentration en calcium, la production d'espèces activées de l'oxygène (ROS) et l'activation des calpaïnes conduit à la rupture de la membrane lysosomiale, la libération des cathepsines lysosomiales et l'acidification du cytosol. Les calpaïnes et les cathepsines participent à la dégradation des constituants cellulaires et à l'exécution de la nécrose.

Les calpaïnes et les cathepsines peuvent participer à la signalisation de l'apoptose *via* l'activation des caspases.

homologue de la protéine adaptatrice humaine Apaf-1. Les cellules de vers dépourvus du gène *Ced-4* sont incapables de déclencher un processus de mort (Yuan et Horvitz, 1992).

Dans les cellules qui survivent à l'état adulte, *Ced-4* est inhibée par la protéine *Ced-9* qui peut interagir avec elle et empêcher le recrutement de *Ced-3* (Yan *et al.*, 2005). *Ced-9* est un homologue de la protéine *Bcl-2* (Hengartner et Horvitz, 1994). Cette inhibition est levée par la protéine *Egl-1*, homologue des protéines à BH3-seulement, qui peut séquestrer *Ced-9* et libérer *Ced-4* (Figure 7).

## 2.2 L'apoptose chez les mammifères

### 2.2.1 Signaux inducteurs

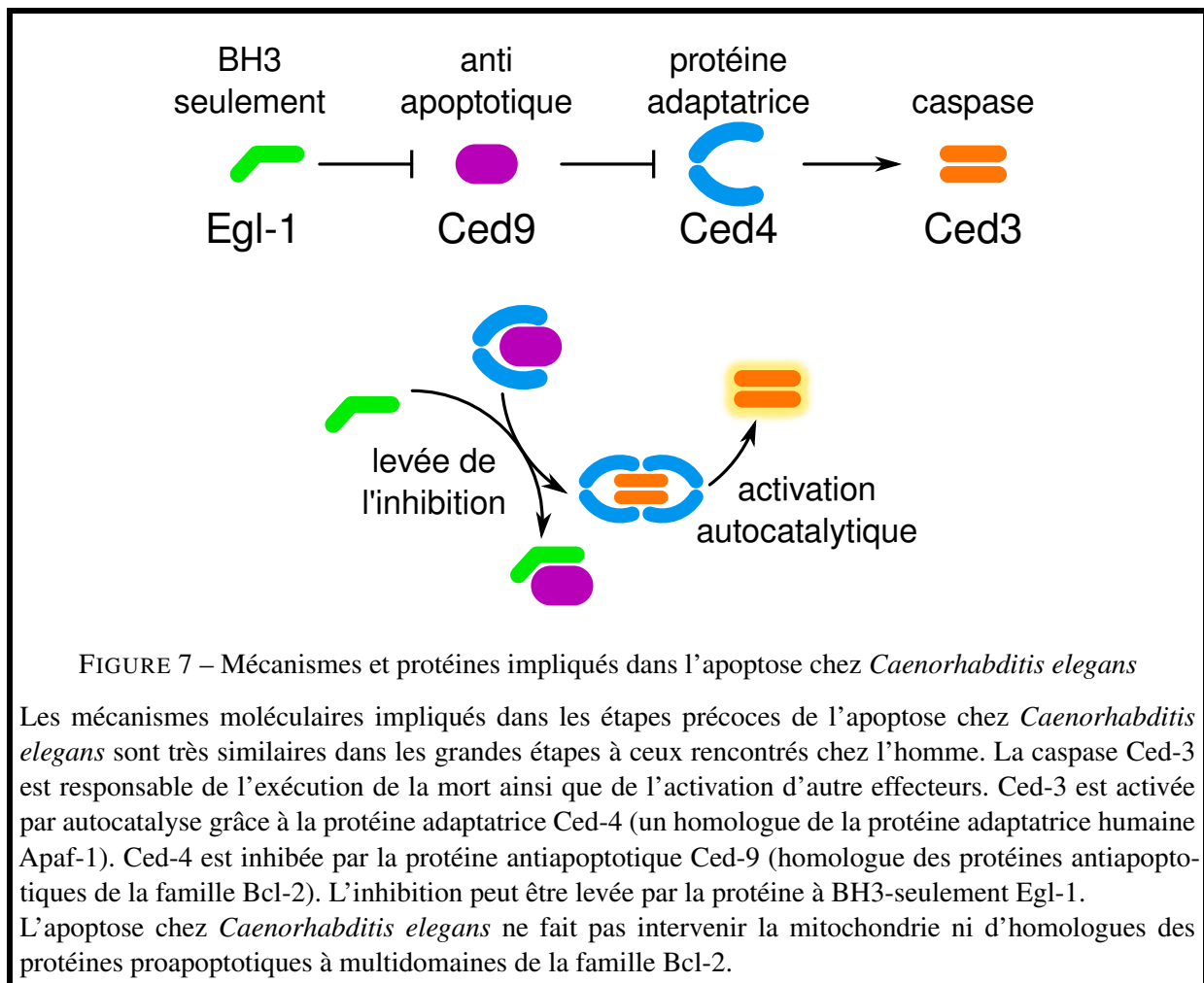
Étant un phénomène physiologique indispensable et omniprésent, l'apoptose doit répondre à une grande variété de signaux inducteurs ou répresseurs. Le déclenchement de l'apoptose doit intervenir aussi bien lors d'événements touchant des tissus ou organes (tel que pendant le développement embryonnaire, quand une grande quantité de cellules peuvent être ciblées), que lors de processus très ciblés (élimination de cellules endommagées, sélection des lymphocytes).

On distingue principalement deux types de signaux, définissant deux voies de signalisation apoptotique. Les signaux externes à la cellule sont principalement reliés à l'activation des récepteurs de mort cellulaire et déclenchent la voie dite extrinsèque. Les signaux internes à la cellule agissent *via* la voie intrinsèque, intimement reliée aux mitochondries.

**2.2.1.1 Signaux extracellulaires** Au cours du 19<sup>ème</sup> siècle, Bruns s'interroge sur la rémission inattendue de patients atteints de cancer lorsque ces derniers étaient touchés par une infection bactérienne aigüe (Bruns, 1868). Ces résultats sont redécouverts quelques années plus tard par Coley qui utilise des extraits de *Streptococcus pyogenes* comme traitement pour ses patients (Coley, 1891). Le facteur responsable, une protéine, est identifié dans les années 60-70 comme facteur nécrosant des tumeurs (O'Malley *et al.*, 1962; Carswell *et al.*, 1975) et la protéine est exprimée et purifiée en 1984 (Pennica *et al.*, 1984).

Le TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ) est aujourd'hui connu comme une cytokine de la superfamille du TNF. Les membres de cette famille, au nombre d'une vingtaine, sont principalement des protéines membranaires extracellulaires et possèdent des récepteurs extracellulaires spécifiques formant la superfamille du TNF-R (récepteur du TNF). Ces couples ligand-récepteur sont impliqués dans une grande variété de processus cellulaires tels que la régulation du système immunitaire, la survie cellulaire ou encore l'apoptose. Les ligands et leurs récepteurs ont la capacité de former des trimères. La fixation d'un trimère de ligand entraîne l'association de trois récepteurs et, pour la majorité d'entre-eux, le recrutement de protéines adaptatrices permettant la transduction du signal. Ces protéines adaptatrices possèdent à la fois un domaine homologue de la partie intracellulaire du récepteur et un domaine d'interaction permettant le recrutement d'une protéine transductrice parmi lesquelles on retrouve de nombreux messagers activateurs de kinases ou facteurs de survie cellulaire (JNK, p38, ERK, PI3K, NF- $\kappa$ B).

Les récepteurs impliqués dans la signalisation de signaux de mort et les protéines adaptatrices associées possèdent un domaine d'homologie caractéristique d'environ 80 acides aminés : le domaine de mort (DD, Death Domain). Le complexe RIP/TRADD (Receptor interacting protein/TNF-R Associated Death Domain protein) et FADD (Fas Associated Death Domain protein) sont les principales protéines



adaptatrices de cette voie de signalisation. La voie extrinsèque conduit au déclenchement de l'apoptose principalement *via* une signalisation dépendante des caspases initiatrices 8 et 10.

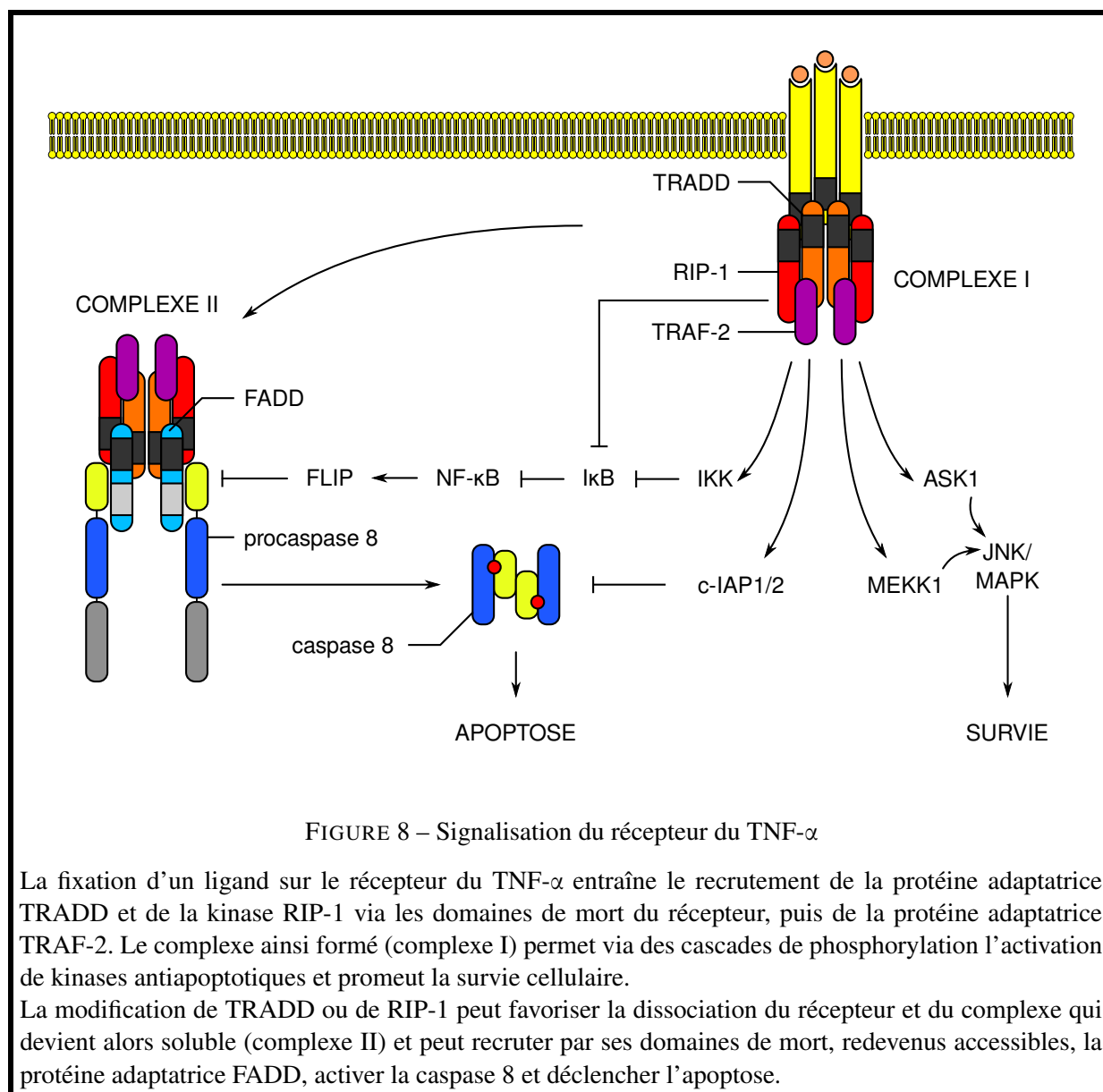
**Signalisation *via* les récepteurs du type Fas** Également connu sous le nom de CD95 ou Apo1, le récepteur de mort Fas est sensible à la fixation de son ligand Fas-L qui entraîne sa trimérisation et le recrutement, côté intracellulaire du récepteur, de la protéine adaptatrice FADD sur le domaine de mort (Death Domain). FADD possède un second domaine d'homologie, le domaine DED ou Death Effector Domain, capable d'interagir avec les procaspases 8 (ou FLICE) et 10 ainsi qu'avec diverses protéines inhibitrices. Sa structure en hélices- $\alpha$  est comparable à celle du domaine de mort, du domaine CARD (APAF-1, procaspases effectrices) ou encore du domaine pyrine (PYD retrouvé dans les PYCARD, les récepteurs NOD-like ou encore certaines caspases). Le recrutement des procaspases 8 et 10 *via* le domaine DED conduit à une augmentation de la concentration locale en procaspase et à l'activation par un clivage autocatalysé. Le complexe ainsi formé est nommé DISC (Death Inducing Signal Complex).

La fixation des procaspases sur le domaine DED peut entrer en compétition avec la fixation de la protéine inhibitrice FLIP (FLICE inhibitory protein). FLIP est structuralement très proche de la caspase 8 et possède des homologues des domaines catalytiques rendus inactifs par la substitution d'un résidu cystéine en tyrosine. Elle est notamment exprimée lors des premières étapes d'activation des lymphocytes T ou de façon pathologique dans certaines tumeurs et entraîne un défaut d'activation de la caspase 8 même en présence d'un signal d'activation de Fas. Il existe également des variants humains et viraux ( $\gamma$ -herpesvirus et molluscipoxvirus) de FLIP ne comportant que le domaine DED (Irmeler *et al.*, 1997)

**Signalisation *via* les récepteurs du type TNF-R** La signalisation *via* le récepteur du TNF est plus complexe que celle de Fas. Alors que Fas stimule principalement l'apoptose, le TNF-R joue un rôle dichotomique, impliqué à la fois dans une stimulation des voies de survie cellulaire (à travers l'activation du facteur de transcription nucléaire kappa B, NF- $\kappa$ B et de la kinase JNK) et de mort en activant les caspases 8 et 10. (Figure 8)

Le déclenchement de l'une ou l'autre des voies est principalement dépendant de la localisation du complexe formé par les protéines adaptatrices. En effet, alors que la protéine adaptatrice FADD (associé au récepteur de mort Fas) possède à la fois un domaine de liaison au récepteur et un domaine de recrutement des caspases, la protéine adaptatrice associée au TNF-R (TRADD) ne possède que le domaine de liaison au récepteur.

Lorsque TRADD est recrutée au niveau du récepteur, la kinase RIP (receptor interacting protein) et la protéine adaptatrice TRAF-2 (TNF-R associated factor) peuvent s'associer pour former un complexe membranaire (complexe I). Les domaines en doigts de zinc de TRAF-2 sont capables de recruter et activer la fonction kinase des complexes IKK (I $\kappa$ B kinase). Ces complexes sont responsables de la phosphorylation des protéines I $\kappa$ B (inhibitor of kappa B) connues pour séquestrer NF- $\kappa$ B en rendant inaccessible son signal de localisation nucléaire. Cette phosphorylation résulte en la dissociation du complexe I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B, la relocalisation de NF- $\kappa$ B dans le noyau et la transcription de gènes impliqués dans les mécanismes de survie. En parallèle, TRAF-2 peut recruter MEKK1, un membre de la voie des MAP kinases (mitogen-activated protein kinase), et activer MKK7 puis JNK. NF- $\kappa$ B et JNK pourront favoriser les voies de signalisation anti-apoptotiques (Bcl-2...).



Le complexe TRADD/TRAF-2/RIP peut, suite à des modifications de RIP ou TRADD, se dissocier du récepteur de mort et être relocalisé dans le cytosol. Les domaines de mort deviennent alors accessibles et peuvent recruter la protéine adaptatrice FADD et induire l'activation des caspases 8 et 10 selon un mécanisme tout à fait similaire à celui décrit pour Fas.

**Granzyme B** Alors que la signalisation par les récepteurs de morts fait intervenir un grand nombre d'étapes et de protéines intermédiaires avant l'activation des caspases initiatrices, il existe des mécanismes d'activation plus directs. Le granzyme B est une protéase à sérine qui catalyse le clivage de protéines après un résidu acide. Cette protéase est sécrétée par les lymphocytes T cytotoxiques. Lors de l'apoptose, le granzyme B peut être internalisé par endocytose puis libéré des endosomes par la perforine. Ses cibles principales sont des caspases (Goping *et al.*, 2003), la protéine pro-apoptotique

à BH3-seulement Bid (Sutton *et al.*, 2000) et des protéines de structure du noyau conduisant respectivement à l'activation directe des caspases, au déclenchement de la perméabilisation mitochondriale (voie intrinsèque) et à la dégradation de l'ADN.

**2.2.1.2 Signaux intracellulaires** Parallèlement à la capacité d'intégration de signaux extracellulaires les cellules possèdent également une machinerie interne de contrôle de leur intégrité. Une grande variété d'atteintes intracellulaires peuvent conduire au déclenchement de l'apoptose.

**Stress cellulaires, atteintes à l'intégrité du génome** La protéine p53 est un facteur de transcription, suppresseur de tumeurs. Des altérations de p53 sont fréquemment impliquées dans les cancers humains et l'on estime que son gène est muté dans plus de la moitié des cas, principalement au niveau du site de fixation à l'ADN (Hollstein *et al.*, 1991)

Une grande variété de facteurs peuvent être responsables de l'activation de p53. On compte par exemple des dommages à l'ADN, l'érosion des télomères, la perte de facteurs de survie, une désorganisation du cytosquelette ou encore des conditions d'hypoxie. Les réponses induites par p53, *via* la modulation de l'expression de gènes, ont également une étendue assez large, de la réparation de l'ADN ou l'arrêt du cycle cellulaire (p21, 14-3-3) à la sénescence des cellules ou leur mort par apoptose (Vousden et Lu, 2002).

p53 est maintenue inactive et à de faibles concentrations cellulaires par une interaction avec la protéine Mdm2 qui favorise sa dégradation par ubiquitinylation. Lors de l'intégration d'un signal de stress, la répression exercée par Mdm2 est levée (par exemple les protéines ATM et Chk2 activées lors de dommages à l'ADN phosphorylent p53), la quantité de p53 augmente et module la transcription des gènes cibles. L'aiguillage entre les différentes voies pouvant être activées par p53 dépend de multiples facteurs, en particulier de l'intensité des signaux activateurs et des autres mécanismes de signalisation pouvant être activés conjointement.

Les principaux acteurs de l'apoptose dont la transcription est stimulée par p53 sont les récepteurs de mort Fas/CD95 (Müller *et al.*, 1998) et Killer/DR5 (Wu *et al.*, 1997), la protéine proapoptotique Bax (Miyashita et Reed, 1995), les protéines à BH3 seulement Bid (Sax *et al.*, 2002), Noxa (Oda *et al.*, 2000) et Puma (Nakano et Vousden, 2001) et la protéine adaptatrice Apaf-1 (Moroni *et al.*, 2001).

Par ailleurs il a été mis en évidence un mécanisme de régulation non transcriptionnelle de l'apoptose par p53. La protéine peut être relocalisée du noyau vers le cytosol et la mitochondrie (Marchenko *et al.*, 2000), interagir avec Bcl-x<sub>L</sub> et Bcl-2 et les inhiber (Mihara *et al.*, 2003). Elle peut de plus interagir directement avec Bax (Chipuk *et al.*, 2004) et Bak (Leu *et al.*, 2004) et entraîner leur activation.

#### Stress du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique est un compartiment cellulaire impliqué entre autres dans la maturation et le transport des protéines après traduction. C'est aussi un compartiment de stockage du calcium. Lors de défaillances des fonctions associées au réticulum, comme lors de l'accumulation de protéines non repliées ou lorsque le trafic de protéines est trop élevé, le stress associé peut déclencher une signalisation de mort.

La caspase 12 est localisée au niveau du réticulum endoplasmique. Lors du stress induit par un dérèglement de l'homéostasie calcique ou lors de l'accumulation de protéines, la caspase 12 est activée

par la calpaïne, une protéase dépendante du calcium et entraîne le déclenchement de l'apoptose. En parallèle Bax peut être activée et Bcl-x<sub>L</sub> convertie en protéine proapoptotique par clivage (Nakagawa et Yuan, 2000; Nakagawa *et al.*, 2000).

#### Stress oxydant et espèces activées de l'oxygène / défauts mitochondriaux

Le stress oxydant apparaît lorsque la cellule n'est plus capable de maintenir son équilibre rédox. Un des points déterminants de cet équilibre est la quantité d'espèces activées de l'oxygène présente dans la cellule. Ces molécules très oxydantes sont des dérivés de l'oxygène, radicalaires comme les anions superoxide ( $O_2^{\bullet-}$ ), hydroxyle ( $HO^{\bullet}$ ), peroxy ( $RO_2^{\bullet}$ ) et alkoy ( $RO^{\bullet}$ ) ou non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Des dérivés de l'azote sont également impliqués d'une manière similaire (peroxynitrite, monoxyde d'azote). Les espèces activées de l'oxygène sont principalement produites au niveau de la mitochondrie par les complexes I et III de la chaîne respiratoire, mais d'autres sources cellulaires existent (peroxysomes, réticulum endoplasmique...). Elles participent dans les conditions physiologiques à la transduction de divers signaux et sont maintenues à de faibles concentrations par plusieurs systèmes de contrôle enzymatiques (superoxide dismutase, catalase, glutathion peroxydase) et par des molécules antioxydantes (glutathion, vitamines C et E).

Diverses hypothèses existent quant au rôle des espèces activées de l'oxygène au cours de l'apoptose. Elles participent tout d'abord à une oxydation générale des constituants cellulaires et engendrent par conséquent des dommages susceptibles d'induire l'apoptose (altérations de l'ADN, de protéines, des membranes biologiques...). Elles semblent impliquées dans la signalisation de la voie extrinsèque en participant à la régulation de l'inhibiteur de l'activation de la caspase 8, FLIP (Wang *et al.*, 2008). Il a également été montré que l'interaction entre le cytochrome c et les cardiolipides de la mitochondrie était sensible à leur degré d'oxydation (Shidoji *et al.*, 1999; Ott *et al.*, 2007) ce qui pourrait présenter un élément de régulation de sa relocalisation dans le cytosol.

**Agents infectieux** De nombreux virus sont connus pour posséder la capacité de détourner la machinerie apoptotique. Ainsi les virus de l'hépatite C, d'Epstein Barr, les papillomavirus... peuvent bloquer le déclenchement de l'apoptose afin de contrer les processus spécifiques d'élimination des cellules infectées. À l'inverse les virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou de l'hépatite B peuvent déclencher l'apoptose afin de favoriser leur dissémination dans l'organisme hôte.

Lors d'une infection par le VIH, l'intégrité de la membrane mitochondriale est altérée. La protéine Vpr du virus HIV est un des candidats qui pourrait participer à la perméabilisation de la membrane externe puis l'activation de la caspase 9 (Arnoult *et al.*, 2003). L'activation pourrait être dépendante de la caspase 8 qui est activée directement par la protéase du VIH-1 (Nie *et al.*, 2002).

Les bactéries sont également capable de moduler l'apoptose. Bien qu'une stratégie fréquente soit de l'inhiber pour favoriser une niche de développement, notamment grâce aux protéines IAP (inhibitor of apoptosis) ciblant les caspases, certaines bactéries au contraire la stimulent par exemple en sécrétant des toxines pouvant former des pores dans les membranes biologiques (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*). D'autres bactéries peuvent déclencher l'apoptose en inhibant la synthèse protéique comme *Corynebacterium diphtheriae* ou *Pseudomonas aeruginosa* (Weinrauch et Zychlinsky, 1999).

**Rôle des céramides** Les céramides sont des sphingolipides (N-acylsphingosine) pouvant servir à la transduction de signaux cellulaires, par exemple lors de la différenciation ou de l'arrêt du cycle cellulaire. De même, lors de l'apoptose, les céramides jouent un rôle de second messager. Ainsi lors de l'apoptose induite par les UV, la synthèse des céramides par la céramide synthase est stimulée et déclenche l'apoptose (Uchida *et al.*, 2003). Une des voies dont l'implication a été mise en évidence dans cette signalisation est la voie des MAP kinases. La kinase p38 MAPK est activée par la présence de céramide et induit la translocation de Bax vers la mitochondrie. Cet effet est corrélé avec l'inactivation des kinases de survie Akt et PI3K (Kim *et al.*, 2008). L'implication directe des céramides sur la régulation des protéines de la famille Bcl-2 est un sujet encore mal connu. Certaines hypothèses suggèrent que ces lipides jouent un rôle direct sur l'insertion et l'oligomérisation de Bax, l'activation de partenaires de Bax tel que tBid (via la cathepsine D) ou encore la malléabilité de la membrane mitochondriale externe (Taha *et al.*, 2006). Les céramides pourraient par ailleurs jouer un rôle dans la constitution même du canal permettant la libération des facteurs apoptogéniques mitochondriaux (Colombini, 2010). Il a été montré *in vitro* que la présence de céramides favorise la perméabilisation de mitochondries ou de liposomes par Bax (Ganesan *et al.*, 2010).

### 2.2.2 Les caspases : des protéases aux fonctions variées

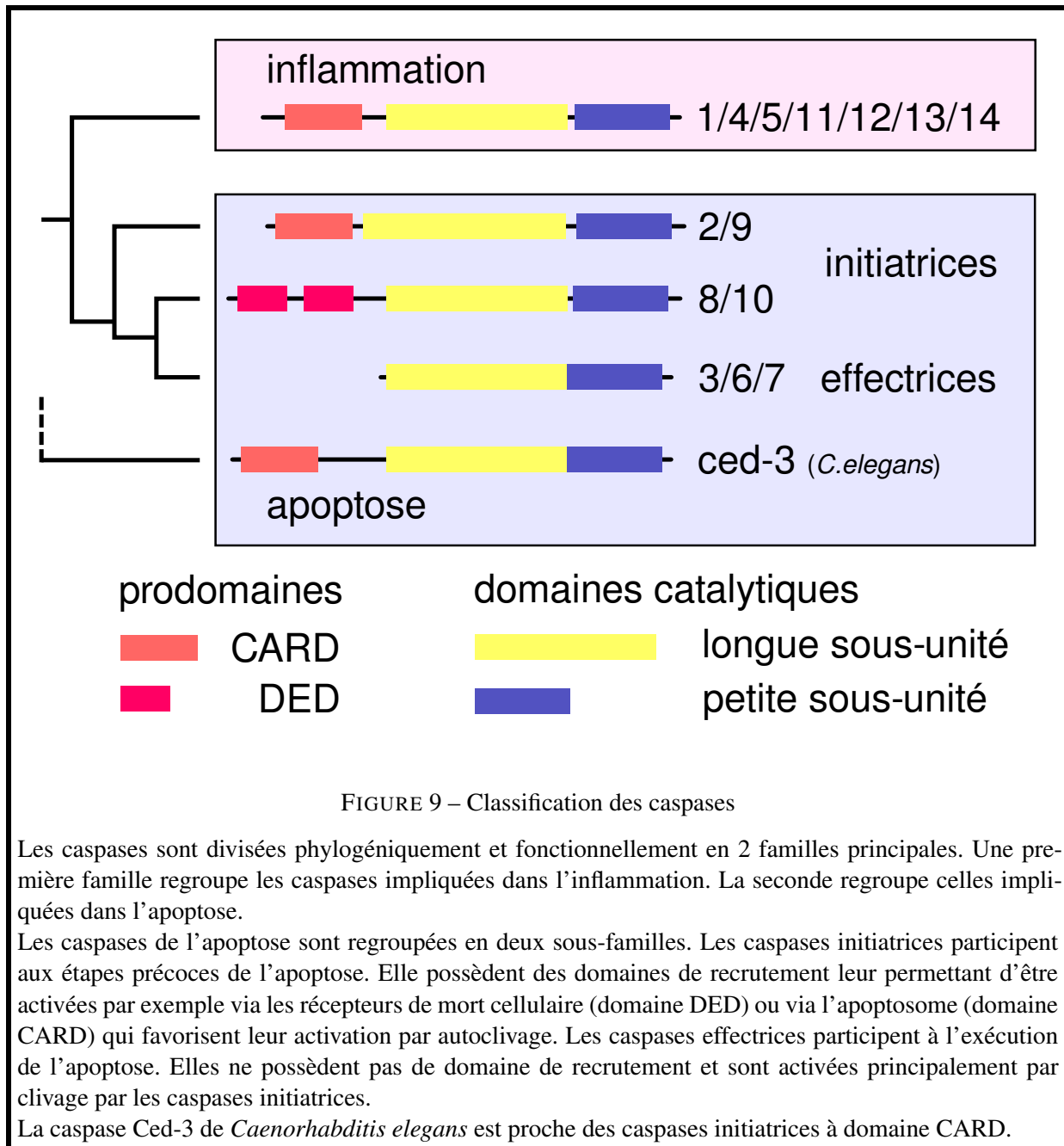
L'implication de certaines caspases est le critère biochimique majeur participant à la définition moléculaire de l'apoptose. Les caspases (cystéine-aspartate proteases) sont des protéases à cystéines. Le résidu cystéine contenu dans le site actif de la protéase peut réagir, de par ses propriétés nucléophiles, avec un résidu acide de la protéine substrat. Pour les caspases ce résidu est un aspartate.

Les caspases forment une famille sur la base d'une homologie de séquence, cependant toutes ne sont pas impliquées dans l'apoptose. La première caspase à avoir été identifiée (caspase 1) est également connue sous le nom d'ICE (interleukin-1 $\beta$  converting enzyme), elle est impliquée dans la maturation de l'interleukine-1 $\beta$  une protéine médiatrice de l'inflammation (Thornberry *et al.*, 1992). Rapidement, il apparaît qu'il existe une homologie avec la protéase du ver *Caenorhabditis elegans*, Ced-3, caractérisée en 1993 (Yuan *et al.*, 1993) et dont le gène avait été identifié par Horvitz dix ans auparavant comme un régulateur majeur de l'apoptose (Horvitz *et al.*, 1983).

**2.2.2.1 Éléments structuraux** Les caspases, comme la plupart des protéases et autres enzymes potentiellement dangereuses pour la cellule, sont synthétisées sous forme de zymogène, un précurseur inactif nommé procaspase.

Les procaspases comportent un prodomaine de taille variable (quelques acides-aminés à plusieurs centaines) ainsi que deux domaines très conservés qui constitueront la forme active de la caspase après clivage et élimination du prodomaine. Le prodomaine est principalement impliqué dans la reconnaissance des molécules adaptatrices lors de la transduction des signaux de mort (ou d'inflammation) et possède ainsi des domaines particuliers évoqués auparavant, les domaines DED (death effector domain) et CARD (caspase-recruitment domain). Le prodomaine est généralement clivé au niveau d'un aspartate et il existe des cascades d'activation des caspases ainsi que la possibilité d'une auto-activation qui sera explicitée par la suite.

Les différents domaines rencontrés et l'homologie entre les membres de la famille permettent de classer les caspases en deux catégories principales qui coïncident sensiblement avec leurs fonctions cellulaires (Figure 9).



La première catégorie ne sera pas détaillée ici, elle correspond aux caspases impliquées dans l'inflammation qui possèdent pour la plupart un domaine CARD. La seconde catégorie correspond aux caspases impliquées dans l'apoptose qui peuvent être classées en trois sous-familles.

Les deux premières sous-familles sont constituées des caspases intervenant dans les étapes précoces de l'apoptose. Ces caspases sont nommées caspases initiatrices, elles participent à la transduction des

signaux de mort. À cette fin, elles possèdent un domaine de recrutement par une protéine adaptatrice. La nature de ce domaine discrimine les caspases activées par les récepteurs de mort (caspases 8 et 10) qui possèdent un double domaine hydrophobe DED et les caspases activées lors de la voie intrinsèque (caspases 9 et 2) qui possèdent un domaine CARD riche en acides aminés chargés.

La troisième sous-famille comprend les caspases impliquées dans les étapes d'exécution du processus apoptotique : les caspases 3, 7 et 6. Elles sont par conséquent dénommées caspases effectrices ou caspases exécutrices. Leur prodomaine est très court (moins d'une trentaine d'acides aminés) et ne contient aucun domaine de recrutement.

La forme active des caspases est un hétérotétramère de deux petites sous-unités (p10 chez la caspase 8) et deux grandes sous-unités (p20 chez la caspase 8), chaque hétérodimère d'une petite et d'une grande sous-unité étant obtenu par le clivage d'un zymogène et l'élimination du prodomaine (Thornberry *et al.*, 1992). La structure en tétramère est requise pour l'activité de la caspase.

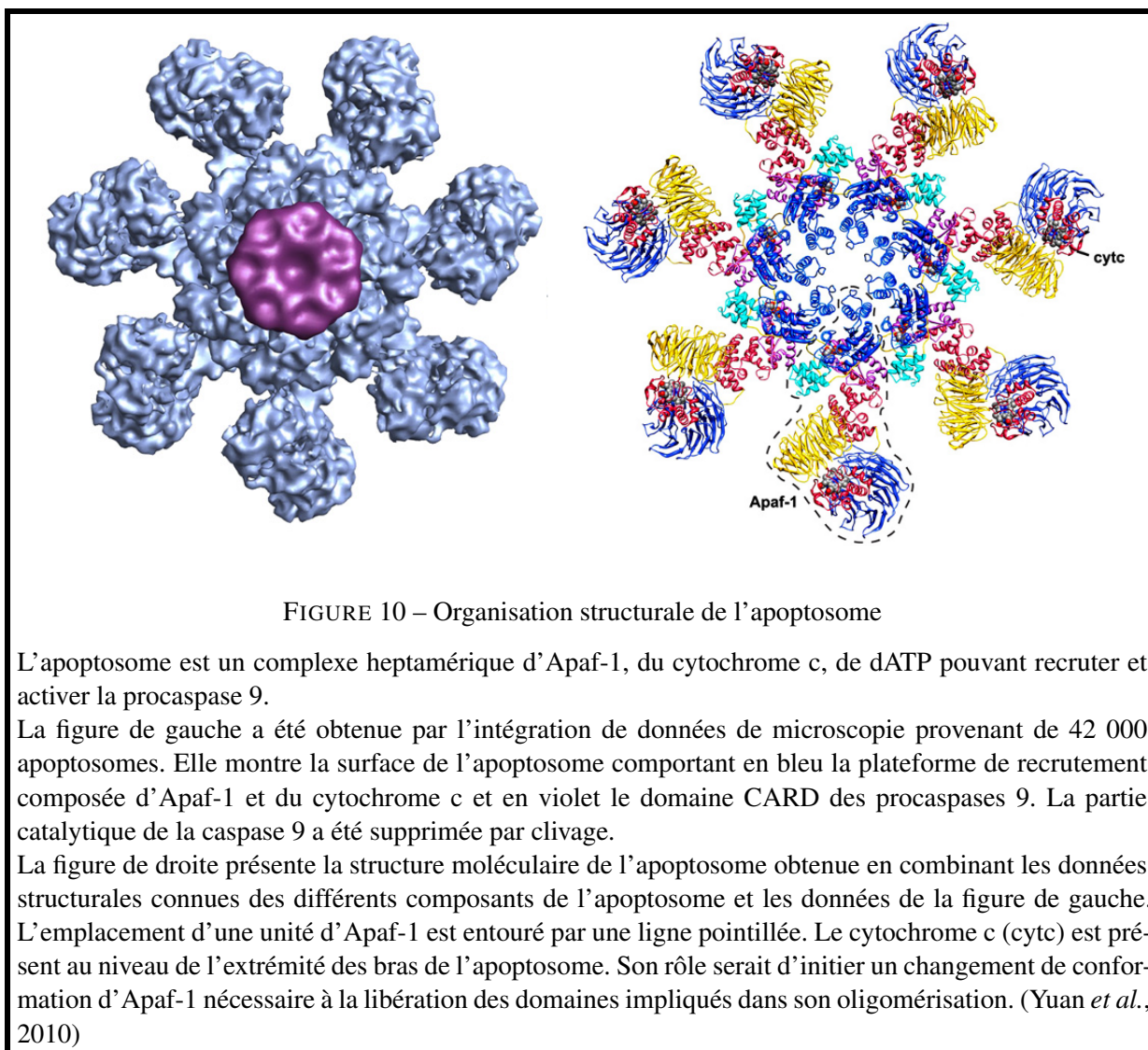
Les détails moléculaires des mécanismes d'activation des caspases sont encore controversés. Les procaspases initiatrices ne sont pas totalement dépourvues d'activité et dans certaines conditions sont capables de catalyser leur propre clivage (Yamin *et al.*, 1996). Lorsqu'elles sont recrutées au niveau des récepteurs de mort ou lors de la formation de l'apoptosome (Figure 10), la concentration locale en procaspases augmente et les zymogènes acquièrent une activité suffisante pour l'autocatalyse des clivages requis pour leur activation.

Les procaspases effectrices ne possèdent pas de domaine de recrutement et ne peuvent former de complexes d'autoactivation. Elles doivent être activées directement par les autres caspases ou par d'autres protéases (*trans*-activation) telles que le granzyme-B.

**2.2.2.2 Principales fonctions des caspases impliquées dans l'apoptose** Les caspases impliquées dans l'apoptose sont pour la majorité essentielles. Des souris déficientes en caspases initiatrices 8 ou 9 meurent lors des phases tardives du développement embryonnaire. Il en est de même pour les protéines adaptatrices Apaf-1 et FADD. La déficience en caspase effectrice 3 est létale à un stade périnatal.

Les substrats des caspases sont de nature très variée. Les caspases participent aussi bien à la signalisation du processus apoptotique qu'à son exécution. Dans un premier temps les caspases initiatrices participent à l'activation de l'apoptose. Cette étape est fortement régulée et il existe des mécanismes permettant l'annulation du processus (par exemple une inhibition par les IAP). Dans des stades plus tardifs les caspases exécutrices dégradent des constituants cellulaires indispensables et l'apoptose entre dans une phase irréversible conduisant à la mort de la cellule.

**2.2.2.3 Cascade d'activation des caspases** Les caspases initiatrices 8, 9 et 10 participent directement au clivage et à l'activation des caspases 3 et 7 pour lesquelles elles possèdent une forte affinité (Fernandes-Alnemri *et al.*, 1996; Muzio *et al.*, 1997; Stennicke *et al.*, 1998). Elles participent indirectement à l'activation de la caspase 9 en stimulant les mécanismes de perméabilisation mitochondriale contrôlés par la famille Bcl-2. Les caspases 8 et 10 sont ainsi capables d'activer la protéine propapoptotique Bid et de créer un lien entre les voies extrinsèque et intrinsèque (Li *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998; Milhas *et al.*, 2005).



Une fois activées les caspases peuvent participer à une boucle autoamplificatrice. Les caspases 8 et 10 peuvent catalyser l'activation de leurs zymogènes. La caspase 6 est substrat de la caspase 3 et peut elle-même activer la caspase 8. Les caspases 8, 6, 3 et 7 clivent leur inhibiteur XIAP diminuant ou abolissant sa capacité inhibitrice (Deveraux *et al.*, 1999). La caspase 3 peut cliver la protéine proapoptotique Bad et stimuler indirectement la perméabilisation mitochondriale (Condorelli *et al.*, 2001).

### 2.2.3 Exécution de l'apoptose et point de non-retour

Des dizaines de protéines sont substrats des caspases. De nombreuses voies de signalisation ou fonctions cellulaires sont ainsi affectées lors de l'exécution de l'apoptose. Parmi ces substrats on compte des protéines du cycle cellulaire (Mdm2, p21, p27), du métabolisme de l'ADN (PARP, topoisomérase I) et de l'ARN, des facteurs de transcription (NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B- $\alpha$ ), des protéines du cytosquelette (Actine,  $\beta$ -caténine, fodrine), des kinases (Akt/PKB, MEKK1, PKC) et phosphatases (PP2A)...

La caspase 3 peut cliver et empêcher le rôle antiapoptotique de Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub> en les convertis-

sant en facteurs proapoptotiques (Cheng *et al.*, 1997; Kirsch *et al.*, 1999; Basañez *et al.*, 2001). Elle libère également la DNase CAD (caspase activated dnase) en clivant son inhibiteur iCAD (Enari *et al.*, 1998). Cette phase de l'apoptose est généralement considérée comme étant irréversible. Les organites sont démantelés, la synthèse protéique est arrêtée, les principaux constituants cellulaires sont dégradés. L'intégrité de la membrane plasmique est conservée tardivement et l'exposition des phosphatidylsérines sur son feuillet externe permet la reconnaissance et l'élimination des cellules évitant le déclenchement d'un processus inflammatoire.

#### INDUCTION :

La cellule peut intégrer des signaux de mort provenant de différentes origines. Les signaux de la **voie extrinsèque** sont reçus *via* les **récepteurs de mort** ou encore par l'internalisation du **granzyme B**. La signalisation *via* les récepteurs de mort induit l'activation des **caspases initiateur 8 et 10**. En parallèle, des facteurs de survie cellulaire, tels que le facteur de transcription **NF-κB**, peuvent être activés. Cette première étape de signalisation de l'apoptose est réversible.

Les signaux provenant de la **voie intrinsèque**, par exemple un **stress ou des dommages cellulaires** ou encore l'activation de **p53** suite à des **dommages de l'ADN**, conduisent, entre autres, à l'activation des protéines proapoptotiques de la **famille Bcl-2**. Des signaux particuliers, comme un **stress du réticulum endoplasmique**, peuvent conduire au déclenchement de l'apoptose par des acteurs de la nécrose (ici, l'activation de la **caspase 12** par les **calpaïnes**).

Les voies extrinsèque et intrinsèque sont reliées par des facteurs communs. La protéine **Bid** peut être clivée et activée par la caspase 8 ou par le Granzyme B.

#### ACTIVATION :

Cette phase correspond à la libération de facteurs apoptogéniques de la **mitochondrie** et à l'activation des **caspases effectrices**. Les facteurs apoptogéniques mitochondriaux sont situés dans l'espace intermembranaire. Leur libération nécessite la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe. Cette perméabilisation est contrôlée par les protéines de la **famille Bcl-2**.

La libération du **cytochrome c** conduit à la formation, avec la protéine adaptatrice **Apaf-1**, de l'**apoptosome** et à l'activation de la **caspase 9**. Les protéines **EndoG** et **AIF** participent à la dégradation de l'ADN. Les protéines **Smac/Diablo** et **HtrA2/Omi** sont des inhibiteurs des IAPs (protéines inhibitrices des caspases).

Les caspases initiateur (8, 10, 9) activent les caspases exécuteur 3 et 7.

#### EXÉCUTION :

Le déclenchement de cette phase de l'apoptose conduit à la dégradation des principaux constituants cellulaires, par exemple, par les **caspases effectrices** et la **DNase CAD** qui est activée par clivage de son inhibiteur iCAD.

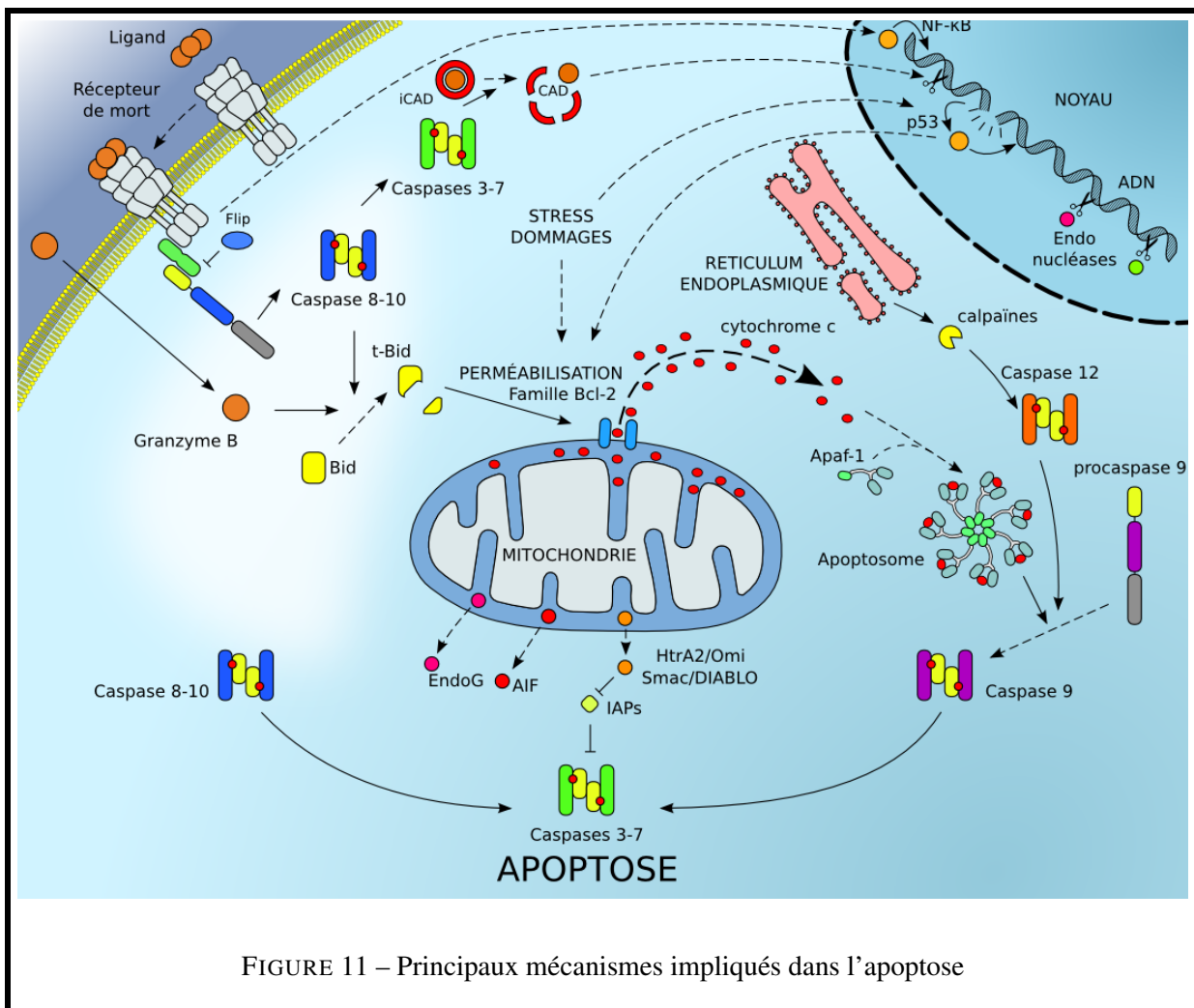


FIGURE 11 – Principaux mécanismes impliqués dans l'apoptose



# La mitochondrie, organe central de la voie intrinsèque de l'apoptose

Dans chaque ami, il y a la moitié  
d'un traître.

Antoine de Rivarol (1753–1801)

## Sommaire

|     |                                                                               |           |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1   | Organisation des mitochondries et principales fonctions cellulaires . . . . . | <b>33</b> |
| 1.1 | Structure . . . . .                                                           | 33        |
| 1.2 | Fonctions mitochondriales non apoptotiques . . . . .                          | 34        |
| 1.3 | Mécanismes d'import des protéines mitochondriales . . . . .                   | 37        |
| 1.4 | Dynamique mitochondriale . . . . .                                            | 39        |
| 2   | Rôle des protéines de l'espace intermembranaire dans l'apoptose . . . . .     | <b>41</b> |
| 2.1 | Le cytochrome c . . . . .                                                     | 41        |
| 2.2 | L'AIF . . . . .                                                               | 42        |
| 2.3 | Protéines inhibitrices des IAP . . . . .                                      | 43        |
| 2.4 | L'endonucléase G . . . . .                                                    | 44        |
| 3   | La famille Bcl-2 et la perméabilisation de la membrane externe . . . . .      | <b>44</b> |
| 3.1 | La famille Bcl-2 . . . . .                                                    | 44        |
| 3.2 | Mécanismes de perméabilisation de la membrane externe . . . . .               | 56        |

## 1 Organisation des mitochondries et principales fonctions cellulaires

### 1.1 Structure

Chez les organismes eucaryotes, les mitochondries sont des organites cellulaires d'origine endosymbiotique. Elles ont une taille de 500 nm à 10 µm, possèdent leur propre génome et sont constituées de compartiments séparés du reste de la cellule par une double membrane.

Le premier compartiment, situé au cœur des mitochondries, est appelé matrice mitochondriale en raison de la forte viscosité due à la présence de nombreuses enzymes solubles de voies métaboliques

majeures (cycle de Krebs,  $\beta$ -oxydation des acides gras, métabolisme de l'aspartate et du glutamate, une partie du cycle de l'urée...), plusieurs copies du génome mitochondrial ainsi que les composants requis pour l'expression des gènes mitochondriaux (ribosomes, ARNs de transfert). Ce compartiment est délimitée par une membrane perméable à l'oxygène et aux ions hydrogénocarbonate mais très peu aux protons : la membrane interne mitochondriale. On retrouve dans cette membrane les protéines impliquées dans les oxydations phosphorylantes telles que les protéines des complexes de la chaîne respiratoire, l'ATP synthase, les transporteurs du phosphate et des nucléotides adényliques ainsi que la machinerie d'import des protéines de la matrice et de la membrane interne (complexes TIM).

La mitochondrie est séparée du reste de la cellule par une seconde membrane, la membrane mitochondriale externe. Celle-ci comporte un canal perméable aux petites molécules (moins de 1500 Da) le VDAC (voltage dependent anion channel), ainsi que les protéines de la machinerie d'import, de tri et d'assemblage des protéines (complexes TOM, SAM). L'espace résultant entre les deux membranaires mitochondriales, appelé espace intermembranaire, a une composition ionique similaire à celle du cytosol. On y retrouve par exemple des enzymes du métabolisme (adénylate kinase, créatine kinase), un transporteur d'électrons de la chaîne respiratoire, le cytochrome c faiblement associé à la face externe de la membrane interne ainsi que, chez certaines espèces, les protéines Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, AIF.

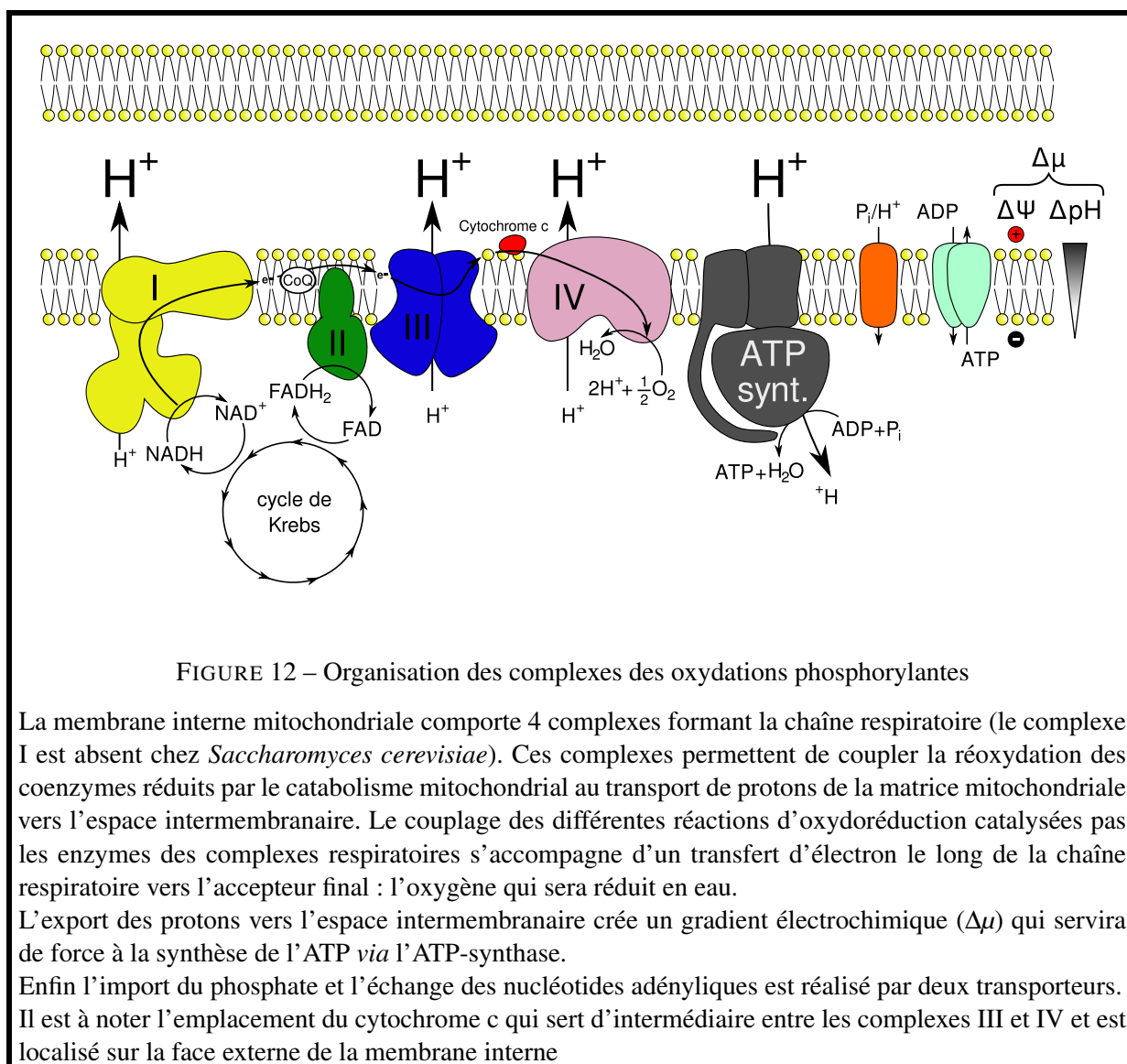
La surface de la membrane interne est très supérieure à celle de la membrane externe et forme des invaginations isolant des portions de l'espace intermembranaire. Ces structures ont la forme de crêtes sur des clichés de microscopie et de sacs et tubules en tomographie. Il est généralement considéré que les crêtes mitochondriales forment un compartiment à part entière dans lequel sont contenus les complexes des oxydations phosphorylantes et donc la majeure partie du cytochrome c. Cette considération est importante pour la compréhension des mécanismes de l'apoptose. En effet, un des points clé de la voie intrinsèque (mitochondriale) étant la libération du cytochrome c, une réorganisation de ce compartiment peut être nécessaire à la transduction du signal de mort. La libération du cytochrome c pourrait notamment être régulée par une réorganisation des jonctions des crêtes mitochondriales dépendante de la dynamine OPA1 (Arnoult *et al.*, 2005).

## 1.2 Fonctions mitochondriales non apoptotiques

### 1.2.1 Production d'énergie par les oxydations phosphorylantes

Chez les eucaryotes, la production d'énergie sous forme d'ATP (adénosine 5'-triphosphate) peut avoir lieu dans les mitochondries en couplage à une consommation de dioxygène. Les complexes de la chaîne respiratoire (I, II, III et IV) en association avec les transporteurs d'électrons (quinones, centres fer-soufre, cytochromes) permettent la réoxydation des cofacteurs réduits (NADH, FADH<sub>2</sub>) produits par le cycle de Krebs ou la  $\beta$ -oxydation et le transport des électrons en résultant jusqu'à l'accepteur final, le dioxygène, qui sera réduit en eau. (Figure 12)

La composition de ces complexes est variable selon les espèces. La levure *S. cerevisiae* a une organisation différente de la chaîne respiratoire. Elle ne possède pas de complexe I. À la place une NADH déshydrogénase interne et plusieurs déshydrogénases mitochondriales (glycérol-3-phosphate déshydrogénase, NADH déshydrogénase interne et externe, lactate déshydrogénase) font office de point d'entrée



des substrats dans les réactions d'oxydation catalysées par la chaîne respiratoire.

Le transport d'électrons au fil de la chaîne respiratoire est couplé à un transfert de protons depuis la matrice vers l'espace intermembranaire au niveau des complexes I, III et IV. Ce transfert continu de protons génère un gradient de pH de part et d'autre de la membrane interne ( $\Delta\text{pH}$ ) acidifiant l'espace intermembranaire ainsi qu'une différence de potentiel électrique ( $\Delta\Psi$ ). L'addition de ces deux composants résulte en une force électrochimique, la force proton-motrice ( $\Delta\mu$ ) utilisée par l'ATP synthase pour la phosphorylation de l'ADP en ATP (Mitchell, 1961). Cette force participe également au fonctionnement des transporteurs de la membrane mitochondriale interne

## 1.2.2 La mitochondrie et le calcium

**1.2.2.1 Régulation de la production d'ATP** À faibles concentrations (environ 500 nM), le calcium libre est un activateur à large spectre d'action de la production d'ATP. Par exemple plusieurs déshydrogénases voient leur activité augmenter en présence de calcium (NADH déshydrogénase, isocitrate déshydrogénase,  $\alpha$ -cétoglutarate déshydrogénase). Le fonctionnement de l'ATP synthase et le transport des nucléotides adényliques sont également favorisés par de faibles concentrations de calcium (Gunter *et al.*, 2004)

**1.2.2.2 Régulation de la transition de perméabilité** L'imperméabilité de la membrane interne et le maintien du gradient électrochimique sont des éléments cruciaux dans le fonctionnement physiologique des mitochondries. Lorsque la cellule est en déficit énergétique, ce gradient est préservé afin de maintenir des fonctions mitochondriales basales. Ainsi des levures  $\rho 0$  (dépourvues d'ADN mitochondrial), ou ne pouvant terminer l'assemblage de l'ATP synthase, maintiennent le potentiel de membrane nécessaire, par exemple, à l'import des protéines dans la mitochondrie grâce à l'échange électrogénique d'ATP cytosolique contre l'ADP matriciel (Giraud et Velours, 1997).

Dans certaines conditions, telles qu'une concentration en calcium très élevée on observe une dissipation du potentiel de membrane associée à une perméabilisation de la membrane interne (une concentration calcique de 300 ou 80 nmol/mg protéine déclenche la transition de perméabilité en quelques minutes ou quelques heures, respectivement, alors qu'une concentration de 20 nmol/mg protéine n'a aucun effet à long terme sur les mitochondries). L'entrée de solutés de petite taille (moins de 1500 Da) et d'eau dans le compartiment matriciel (en raison de sa forte osmolarité) résulte en son gonflement. La surface de la membrane interne étant très supérieure, en raison de ses nombreux replis, à celle de la membrane externe, le gonflement du compartiment matriciel entraîne la rupture de la membrane mitochondriale externe (Tsujimoto et Shimizu, 2007).

La transition de perméabilisation est dépendante de la formation d'un pore non spécifique, le pore de transition de perméabilité (PTP), dont l'ouverture est régulée par la concentration en calcium et le potentiel de membrane. La composition de ce pore est toujours en débat. Le PTP réunirait des protéines des membranes interne et externe telles que le transporteur de nucléotides adényliques de la membrane interne (ANT), la porine de la membrane externe (VDAC) et la protéine matricielle Cyclophiline-D. Ces protéines ont été identifiées sur la base des tentatives de purification du pore cependant des études montrent que le pore peut être formé en l'absence de VDAC (Krauskopf *et al.*, 2006), de l'ANT (Kokoszka *et al.*, 2004) ou de la Cyclophiline-D (Basso *et al.*, 2005).

L'activité du PTP est modulée par la présence d'inhibiteurs spécifiques des ses composants présumés comme la cyclosporine-A (Cyclophiline-D) ou l'atractylate et l'acide bongkréique (ANT). Le pore a une conductance pouvant aller jusqu'à 1,3 nS (Szabó *et al.*, 1992)

Le PTP a été proposé et longtemps considéré comme le mécanisme de perméabilisation de la membrane mitochondriale externe lors de l'apoptose. Les données récentes suggèrent cependant que l'ouverture du PTP lors de l'apoptose soit une conséquence plus qu'une cause, ait lieu dans les phases tardives du processus et participe à son amplification mais ne soit pas indispensable. Les principaux éléments qui composeraient ou réguleraient le PTP peuvent être supprimés sans affecter la perméabili-

sation de la membrane mitochondriale externe (Baines *et al.*, 2005; Basso *et al.*, 2005; Nakagawa *et al.*, 2000). Par ailleurs la cinétique de libération des facteurs apoptogéniques mitochondriaux (cytochrome c, Smac/Diablo, HtrA2/Omi, AIF, EndoG) n'est pas en accord avec une perméabilisation par rupture de la membrane externe. La libération de l'AIF et d'EndoG est un mécanisme plus tardif que celui du cytochrome c. La libération d'AIF et EndoG semble dépendre de régulateurs différents de ceux impliqués dans le contrôle de la libération du cytochrome c car l'inhibition des caspases réprime spécifiquement leur libération mais pas celle du cytochrome c ni celle de Smac/Diablo et HtrA2/Omi (Arnoult *et al.*, 2003). La libération des facteurs apoptogéniques mitochondriaux est un événement régulé et plus complexe que la simple perméabilisation de la membrane mitochondriale externe. Il semble par exemple exister un lien entre la libération du cytochrome c et celle de Smac/Diablo qui est abolie dans des cellules dépourvues de cytochrome c (Hansen *et al.*, 2006). Ces données expérimentales sont peu compatibles avec l'hypothèse de l'implication du PTP dans les mécanismes de la voie intrinsèque de l'apoptose. Le PTP semble en revanche un acteur important du déclenchement de la nécrose (Nakagawa *et al.*, 2005).

### 1.3 Mécanismes d'import des protéines mitochondriales

Sur les centaines de protéines mitochondriales (600 chez la levure, 1500 chez l'homme) quelques-unes sont encodées par le génome mitochondrial (certaines sous-unités de l'ATP synthase et des complexes respiratoires, une sous-unité mitoribosomale). Les autres proviennent du génome nucléaire et doivent par conséquent être importées depuis le cytosol vers les différents compartiments mitochondriaux. Cette opération est rendue possible par un ensemble de complexes de tri et de transport localisés dans les deux membranes mitochondriales. Il existe quatre complexes majeurs impliqués dans l'import des protéines mitochondriales ainsi que des protéines solubles (Endo et Yamano, 2009; Neupert et Herrmann, 2007).

#### 1.3.1 Le complexe TOM : étape initiale de l'import des protéines

Le complexe TOM (translocase of the outer mitochondrial membrane) est le point d'entrée des protéines avant leur tri et leur routage vers un des autres complexes d'import. Il est composé de deux à trois protéines-canal TOM40 structurées en tonneau- $\beta$  et permettant le passage de protéines dépliées à travers une cavité de 15 à 20 Å. Les protéines prises en charge sont reconnues par trois récepteurs périphériques, les protéines TOM20, TOM22 et TOM70. Les protéines TOM5, TOM6 et TOM7 participent à la régulation de l'import des protéines et de la dynamique du complexe (Endo et Yamano, 2009; Neupert et Herrmann, 2007).

Différentes catégories de protéines peuvent être reconnues par le complexe TOM40 et leurs caractéristiques dépendent principalement de la cible vers laquelle elle sont adressées.

Dans la plupart des cas les protéines importées dans la mitochondrie comportent une préséquence d'import N-terminale clivable qui permet leur reconnaissance au niveau du complexe TOM. C'est le cas des protéines matricielles qui possèdent une préséquence N-terminale de 10 à 80 résidus, riche en acides aminés chargés positivement et ayant la capacité de former une hélice- $\alpha$  amphiphile. Cette hélice est reconnue par TOM20 et TOM70 grâce à un sillon hydrophobe réceptacle. D'autres protéines ne

comportent pas de séquence d'import définie et ce sont plus généralement les propriétés structurales de la protéine qui permettront sa reconnaissance au niveau des complexes d'import.

### **1.3.2 Le complexe TIM23 et l'adressage vers la matrice mitochondriale**

Le complexe TIM23 (translocase of the inner mitochondrial membrane) prend en charge les protéines à destination de la matrice.

TIM23 et TIM17 forment la partie canal du complexe TIM23. Les protéines adressées vers la matrice sont reconnues grâce à leur préséquence et prises en charge directement depuis le complexe TOM par la protéine TIM50 ou depuis l'espace intermembranaire par le récepteur TIM21. Le passage à travers le complexe nécessite un apport énergétique qui est fourni par le potentiel de membrane ainsi que sous forme d'ATP. À leur entrée dans la matrice, les protéines importées sont prises en charge par des protéines chaperons (mtHsp70) et par le complexe PAM (presequence translocase-associated motor) composé des protéines TIM14, TIM16 et TIM44. Dans la majorité des cas, la préséquence sera clivée par la protéase MPP (mitochondrial processing peptidase).

Le complexe TIM23 est par ailleurs impliqué dans l'import et l'insertion dans la membrane interne de protéines ne comportant qu'un seul domaine transmembranaire. Le mécanisme décrit précédemment est alors interrompu au cours du transport dans le complexe TIM23 et les protéines importées sont insérées dans la membrane interne.

### **1.3.3 Les petites protéines TIM**

Ces petites protéines solubles (TIM8/9/10/12/13) sont localisées dans l'espace intermembranaire. Elles permettent un transfert des protéines importées entre la face interne du complexe TOM et les complexes d'import membranaire SAM et TIM22.

### **1.3.4 Les complexes SAM et TIM22 et l'assemblage des protéines membranaires**

Ces deux complexes permettent l'insertion membranaire des protéines des membranes externe et interne. Les protéines importées par ces systèmes ne possèdent pas nécessairement de séquence particulière de reconnaissance. Ce sont plus généralement des éléments structuraux (par exemple des domaines hydrophobes) qui déterminent leur adressage.

SAM (sorting and assembly machinery) rend possible la mise en place dans la membrane externe des protéines structurées en tonneau- $\beta$ . Ces dernières sont transportées depuis le complexe TOM par les petites protéines TIM (TIM8 et TIM13) jusqu'à SAM50 qui, en coopération avec SAM35 et SAM37 (dont le rôle est à ce jour peu clair), va participer à l'intégration de la protéine à tonneau- $\beta$  dans la membrane externe.

Le complexe TIM22 est spécialisé dans l'import dans la membrane interne des transporteurs mitochondriaux et des éléments des complexes d'import de la membrane interne. Dans le cas des sous unités du transporteur des nucléotides adényliques c'est par exemple le motif PX(DE)XX(RK) qui détermine la prise en charge par le complexe. Les petites protéines Tim localisées dans l'espace intermembranaire interviennent vraisemblablement comme protéines chaperon dans cette voie d'import.

### 1.3.5 Import des protéines liées à l'apoptose

**1.3.5.1 Protéines de l'espace intermembranaire** Comme cela sera discuté plus loin, l'espace intermembranaire mitochondrial est un réservoir de protéines impliquées dans les phases d'amplification et d'exécution du signal apoptotique. Les gènes codant pour ces protéines étant nucléaires, elles doivent être importées depuis le cytosol. L'AIF, Smac/DIABLO ou encore HtrA2/Omi possèdent une séquence N-terminale bipartite d'une cinquantaine à une centaine de résidus. Le début de cette séquence est similaire à la séquence d'import des protéines matricielles et est suivi d'un domaine hydrophobe. Une fois l'import dans l'espace intermembranaire réalisé par le complexe TOM, ces protéines sont prises en charge par les protéines de la voie d'import et d'assemblage de l'espace intermembranaire (MIA). Elles acquièrent leur conformation et leurs motifs d'adressage sont clivés par des protéases. Ces dernières étapes empêchent toute prise en charge ultérieure par la machinerie d'import et bloquent les protéines importées dans l'espace intermembranaire. C'est ainsi que d'autres mécanismes devront être mis en place pour la relocalisation cytosolique de ces facteurs apoptogéniques.

Le cytochrome c présente un cas particulier d'import dans l'espace intermembranaire. Synthétisé sous forme d'apoprotéine, la protéine est reconnue par le complexe TOM grâce à de nombreux résidus situés à ses extrémités et à leur organisation structurale. L'originalité du mécanisme réside en le fait que l'import est dépendant de la maturation en la forme active du cytochrome c. Aussi bien l'absence ou l'inactivité de l'hème lyase, une enzyme associée à la membrane interne et responsable de la fixation de l'hème, que la présence de mutations dans la séquence de fixation à l'apocytochrome c abolissent tout import (Dumont *et al.*, 1988; Nargang *et al.*, 1988).

**1.3.5.2 Protéines de la famille Bcl-2** Les protéines de la famille Bcl-2, possèdent pour la plupart une localisation membranaire. Il a été démontré une interaction entre plusieurs membres de la famille Bcl-2 et les protéines du complexe TOM. Il semble cependant que les mécanismes mis en œuvre soient différents de ceux présentés dans les paragraphes précédents.

La protéine Bcl-2 possède deux résidus chargés positivement de part et d'autre de son hélice C-terminale transmembranaire. Ces derniers sont nécessaires à l'intégration de Bcl-2 dans la membrane mitochondriale externe (Motz *et al.*, 2002). La présence de TOM20 est également critique mais pas celle de TOM22 ni l'intégrité du complexe TOM. Ces données suggèrent fortement que cet import se fait par un mécanisme original (Motz *et al.*, 2002).

## 1.4 Dynamique mitochondriale

Les mitochondries ne sont pas des organelles inertes mais sont au contraire très dynamiques. Elles constituent un réseau tubulaire sans cesse en évolution. Le maintien de l'organisation de ce réseau est réalisé par un ensemble de protéines conservées, possédant pour la plupart un domaine GTPase. Trois principaux mécanismes, définis par des approches génétiques chez *Saccharomyces cerevisiae*, participent à la dynamique mitochondriale. La fusion et la fission sont deux mécanismes complémentaires permettant respectivement l'agrégation et la fragmentation du réseau mitochondrial. La tubulation assure le maintien de la forme tubulaire des mitochondries (Okamoto et Shaw, 2005, pour revue).

Ces processus sont fondamentaux pour une cellule et déterminent le bon fonctionnement des fonctions mitochondriales, l'intégrité des organelles ou encore leur transmission lors des divisions cellulaires. L'altération des mécanismes de dynamique mitochondriale peut être à l'origine, chez les mammifères, de pathologies sévères telles que la maladie de Charcot-Marie Tooth de type 2A, l'atrophie optique dominante de type I, le diabète de type 2 (Liesa *et al.*, 2009)

#### **1.4.1 Mécanismes de fusion mitochondriale**

La fusion mitochondriale fait intervenir des protéines à domaine GTPase de la famille des dynamines (Hoppins et Nunnari, 2009, pour revue). Cet événement nécessite la fusion de deux doubles membranes, la membrane interne et la membrane externe. Les protéines Fzo (chez la levure) ou Mfn1/2 (chez les mammifères) sont localisées dans la membrane externe. Elles exposent un domaine en hélices super-enroulées (coiled-coil) à la surface des mitochondries et permettent le rapprochement et la fusion de deux membranes externes par interaction protéine-protéine. Chez les mammifères, Mfn1 et Mfn2 ont un rôle similaire mais semblent présenter des spécificités tissulaires. Une interaction entre la protéine proapoptotique Bax et Mfn2 a été mise en évidence et l'équipe de Richard Youle a montré que Bax et Bak participent à l'activation de Mfn2 et au processus de fusion. Ce rôle pourrait être aboli par un changement de conformation de Bax et Bak lors de l'induction de l'apoptose et laisser place à la fission des mitochondries observée lors du déroulement de l'apoptose (Karbowski *et al.*, 2006)

La fusion de la membrane interne implique la protéine Mgm1 (chez la levure) ou OPA1 (chez les mammifères). Lors de l'import dans la mitochondrie, Mgm1 et OPA1 sont maturées en deux isoformes : une forme longue insérée dans la membrane interne et une forme courte, résultant du clivage d'une région hydrophobe de la protéine, soluble dans l'espace intermembranaire. Ces protéines agiraient en facilitant les contacts entre les membranes internes de mitochondries ayant déjà fusionné leurs membranes externes. Par ailleurs un rôle de Mgm1 et OPA1 a été mis en évidence dans la morphologie des crêtes mitochondriales, des mutants présentant une structure des crêtes désorganisée. Une grande partie d'OPA1 se situe au niveau des jonctions des crêtes. Il a été proposé qu'il faille un remodelage de ces jonctions conjointement à la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe pour permettre la libération du cytochrome c dans le cytosol. Cette hypothèse est notamment soutenue par l'observation du désassemblage des oligomères d'OPA1 lors de l'induction de la perméabilisation mitochondriale par Bid ou Bim (Yamaguchi *et al.*, 2008).

#### **1.4.2 Mécanismes de fission mitochondriale**

Le mécanisme de fission mitochondriale implique également des dynamines à domaine GTPase : Dnm1 (levure) ou Drp1 (mammifères). Dnm1/Drp1 sont des protéines solubles ayant la capacité de s'oligomériser au contact de la membrane mitochondriale. La reconnaissance de Dnm1/Drp1 à la surface la mitochondrie est dépendante de la protéine Fis1, ancrée dans la membrane. Chez la levure deux protéines ont été mise en évidence comme pouvant faire office de protéine adaptatrice de la liaison entre Dnm1 et Fis1, il s'agit de Mdv1 et Caf4 pouvant interagir avec Dnm1 *via* des domaines WD40 et avec Fis1 grâce à leur extrémité N-terminale.

Dnm1/Drp1 guident la fission par constriction des tubules mitochondriaux. Le processus est dépendant de la consommation de GTP.

### 1.4.3 Mécanismes de tubulation

Le mécanisme de tubulation des mitochondries n'a pour le moment été mis en évidence que chez la levure et est dépendant de la protéine Mmm1. Mmm1 est une protéine membranaire ayant la particularité d'être intégrée à la fois dans la membrane interne et dans la membrane externe. Son extrémité N-terminale est matricielle et l'extrémité C-terminale cytosolique. Elle interagit avec d'autres protéines mitochondriales telles que Mdm10 ou Mdm12 et le complexe formé pourrait maintenir la structure tubulaire *via* une interaction avec le cytosquelette ou encore par la formation de structures protéiques rigides autour des tubules mitochondriaux.

Enfin Mmm1 a un rôle supposé dans la formation des crêtes mitochondriale et l'ancrage des nucléoïdes mitochondriaux (ADN mitochondrial) sur la face matricielle de la membrane interne.

## 2 Rôle des protéines de l'espace intermembranaire dans l'apoptose

Comme cela a été décrit précédemment la mitochondrie est l'organite principal impliqué dans la voie intrinsèque. En effet de nombreuses protéines de l'espace intermembranaire peuvent, après réception d'un signal apoptotique, être relocalisées dans le cytosol et participer aux processus d'amplification et d'exécution de l'apoptose.

Les premières protéines mitochondriales à avoir été mises en évidence dans ce rôle sont le cytochrome c (Liu *et al.*, 1996; Kluck *et al.*, 1997) et l'AIF (Susin *et al.*, 1996).

### 2.1 Le cytochrome c

Le cytochrome c est une petite hémoprotéine à fer de 12,5 kDa, soluble dans l'espace intermembranaire mais en interaction faible avec la membrane interne. Protéine extrêmement conservée entre les espèces, elle intervient en tant que transporteur d'électrons entre les complexes III (complexe bc<sub>1</sub>) et IV (cytochrome c oxydase) de la chaîne respiratoire. Au cours de l'apoptose le cytochrome c peut être relocalisé dans le cytosol et interagir avec la protéine adaptatrice Apaf-1. Cette interaction est responsable d'un changement de conformation d'Apaf-1 et de la libération de son domaine CARD et le recrutement de la procaspase 9. Ces étapes conduisent à la formation d'une plateforme heptamérique d'activation de la caspase 9, l'apoptosome.

Seule une fraction limitée (15%) du cytochrome c est libre dans l'espace intermembranaire, la majorité est en interaction (hydrophobe et électrostatique) avec des lipides particuliers de la membrane interne : les cardiolipides. De part leur capacité à former des structures hexagonales inversées les cardiolipides sont également de bon candidats pour expliquer la formation des jonctions entre les deux membranes mitochondriales (Figure 13) (Simbeni *et al.*, 1991). L'affinité du cytochrome c pour les cardiolipides diminue avec leur état d'oxydation. Ainsi, il a été suggéré que la peroxydation induite par les espèces activées de l'oxygène ou par l'activité peroxydase du cytochrome c soit un facteur important intervenant dans sa relocalisation cytosolique (Gonzalvez et Gottlieb, 2007, pour revue).

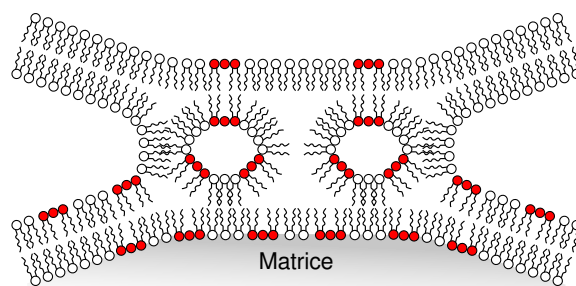


FIGURE 13 – Rôle des cardiolipides dans la formation des sites de contact entre les membranes mitochondriales interne et externe

Les cardiolipides (en rouge sur le schéma) peuvent former des structures hexagonales en micelles inversées. Ces structures peuvent stabiliser les contacts entre les membranes mitochondriales interne et externe.

Les cardiolipides sont des principalement des lipides de la membrane mitochondriale interne. Au niveau des sites de contact il y a un enrichissement en cardiolipides et une fraction est exposée sur la membrane externe. Les sites de contacts pourraient être des zones privilégiées pour le recrutement de la protéine proapoptotique Bid.

## 2.2 L'AIF

L'AIF ou apoptosis-inducing factor est une protéine essentielle. L'absence du gène est létale chez la souris et une forte diminution de son expression conduit à de graves problèmes du développement, notamment au niveau du cerveau et de la rétine. La protéine a une masse moléculaire de 67 kDa et est importée et maturée dans l'espace intermembranaire où elle est conjuguée au cofacteur FAD (flavine adénine dinucléotide). Sa fonction mitochondriale est encore très controversée mais il semble qu'elle intervienne dans l'assemblage ou le maintien du complexe I de la chaîne respiratoire. De par son activité NADH-oxydase elle pourrait également être impliquée dans la régulation des espèces activées de l'oxygène (Apostolova *et al.*, 2006). Dans cette situation l'AIF est ancrée dans la membrane mitochondriale interne par son extrémité N-terminale. Lors de l'induction du processus apoptotique, l'AIF peut être libérée en une forme de 57 kDa après clivage de ce domaine d'ancrage par des protéases de l'espace intermembranaire. Ce clivage peut être réalisé par des protéases à cystéines comme les calpaïnes (Polster *et al.*, 2005) ou les cathepsines, et il a été observé que ceci pouvait être dépendant de la présence de calcium (Norberg *et al.*, 2008). L'implication de ces protéases suggère que l'AIF intervienne dans les phases tardives de l'apoptose ou dans la nécrose. Par ailleurs l'observation que des formes oxydées de l'AIF sont préférentiellement clivées laisse penser à une implication des espèces activées de l'oxygène (Norberg *et al.*, 2010).

Le rôle de l'AIF dans la signalisation de l'apoptose est également soumis à débat. Il est relativement clair que la protéine est relocalisée dans le noyau grâce à deux séquences d'adressage nucléaire et induit la condensation de la chromatine et le clivage de l'ADN mais son mécanisme d'action exact demeure à l'heure actuelle inconnu (Daugas *et al.*, 2000).

## 2.3 Protéines inhibitrices des IAP

Comme cela a été décrit précédemment, les caspases sont les protéines effectrices principales de l'apoptose. Parmi les protéines inhibitrices des caspases, la famille des IAP (inhibitor of apoptosis) regroupe des membres d'origines très diverses. Ainsi les premières protéines IAP découvertes sont virales (baculovirus *Cydia pomonella granulosus*). Par la suite, des homologues chez la drosophile et les mammifères ont été mis en évidence. Les IAPs possèdent un motif répété une à trois fois et homologue entre les membres de la famille. Ce motif nommé domaine BIR (baculovirus IAP repeat) est un doigt de zinc capable de se lier à la forme active des caspases avec une très forte affinité (de l'ordre du nanomolaire) et une spécificité pour certaines caspases en fonction des variants IAP. Par exemple la protéine humaine XIAP peut inhiber spécifiquement les caspases 3, 7 et 9 (Deveraux *et al.*, 1998). Récemment le rôle des IAP dans la dégradation des caspases a été mis en évidence. cIAP-1 est, par exemple, une E3-ubiquitine-ligase et entraîne la dégradation des caspases 3 et 7 (Choi *et al.*, 2009).

### 2.3.1 Smac/DIABLO

Smac/DIABLO (second mitochondrial-derived activator of caspases, direct IAP-binding protein with low pI) est une protéine de 25 kDa identifiée en 2000 simultanément par deux équipes (Du *et al.*, 2000; Verhagen *et al.*, 2000). Elle est homologue aux protéines Grim, Reaper et Hid de la drosophile.

La séquence codant pour le gène de Smac/DIABLO est nucléaire et la protéine doit être importée dans la mitochondrie grâce à une préséquence d'adressage, elle est ensuite clivée sous sa forme soluble active par la protéase IMP (intermembrane protease). Lorsque Smac/DIABLO est libérée dans le cytosol elle peut interagir avec les IAP *via* leur domaine BIR grâce à une courte séquence d'acides aminés N-terminaux (Ala-Val-Pro-Ile) et élimine leur action inhibitrice sur les caspases.

### 2.3.2 HtrA2/Omi

HtrA2 est une protéase à sérine homologue de la protéine bactérienne HtrA/DegP. Son rôle physiologique est encore mal connu mais il a été montré qu'elle possède une activité chaperon et protéase constitutive laquelle est activée par des chocs de température ou des agents inducteurs de la réponse UPR (unfolded protein response) (Gray *et al.*, 2000) notamment grâce à son domaine PDZ capable de se lier aux protéines mal repliées. Outre ce rôle et son implication dans l'apoptose, la participation de HtrA2/Omi à de nombreux autres mécanismes cellulaires est étudiée depuis quelques années (autophagie, cycle cellulaire, dynamique mitochondriale...).

HtrA2/Omi possède également un domaine de liaison aux IAP (Ala-Val-Pro-Ser) homologue de celui de Smac/DIABLO et des domaines IBM (IAP binding motif) de Grim, Reaper, Hid. HtrA2/Omi agit selon un mécanisme en deux étapes. Tout d'abord elle permet la libération des caspases en interagissant avec les IAP de la même manière que Smac/DIABLO cependant elle est également capable d'entraîner leur clivage au lieu de simplement former un complexe stable (Srinivasula *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2003). Un variant de la protéine sans activité protéase peut toujours lever l'inhibition des caspases par les IAP mais avec une efficacité bien moindre (Yang *et al.*, 2003).

## 2.4 L'endonucléase G

L'endonucléase G (EndoG) est une DNase mitochondriale de 33 kDa importée dans l'espace intermembranaire, clivée et présente sous la forme d'un homodimère. Sa fonction lors de l'apoptose est encore controversée. Une déficience pour EndoG est létale chez la souris, les embryons présentent une résistance à l'apoptose induite par le TNF $\alpha$  ou la staurosporine ainsi qu'une dégradation réduite de l'ADN (Zhang *et al.*, 2003). Il a été mis en évidence une participation, indépendante de la présence des caspases, d'EndoG dans la dégradation de l'ADN au cours de l'exécution de l'apoptose (van Loo *et al.*, 2001) cependant son implication directe dans la fragmentation internucléosomale n'est pas clairement établie.

## 3 La famille Bcl-2 et la perméabilisation de la membrane externe

### 3.1 La famille Bcl-2

La première protéine de la famille mise en évidence est Bcl-2 (B cell lymphoma 2) en 1985 par Tsujimoto. En étudiant l'évènement de translocation d'une partie du chromosome 18 vers le chromosome 14 (q32;q21) dans des cellules de type B de patients atteints de lymphome folliculaire, Tsujimoto détermine la séquence nucléotidique proche du point de rupture du chromosome 18 et met en évidence le gène Bcl-2 se retrouvant proche du locus des chaînes lourdes des immunoglobulines et fusionné à une partie du gène. Cette translocation affecte l'expression du gène de fusion et augmente fortement la synthèse de transcrits (Tsujimoto *et al.*, 1985). Dans ces conditions Bcl-2, conjointement à l'action de c-myc, un facteur de transcription oncogène impliqué dans la prolifération cellulaire, entraîne une résistance des précurseurs des lymphocytes de type B à l'apoptose et une tumorigénèse des cellules (Vaux *et al.*, 1988).

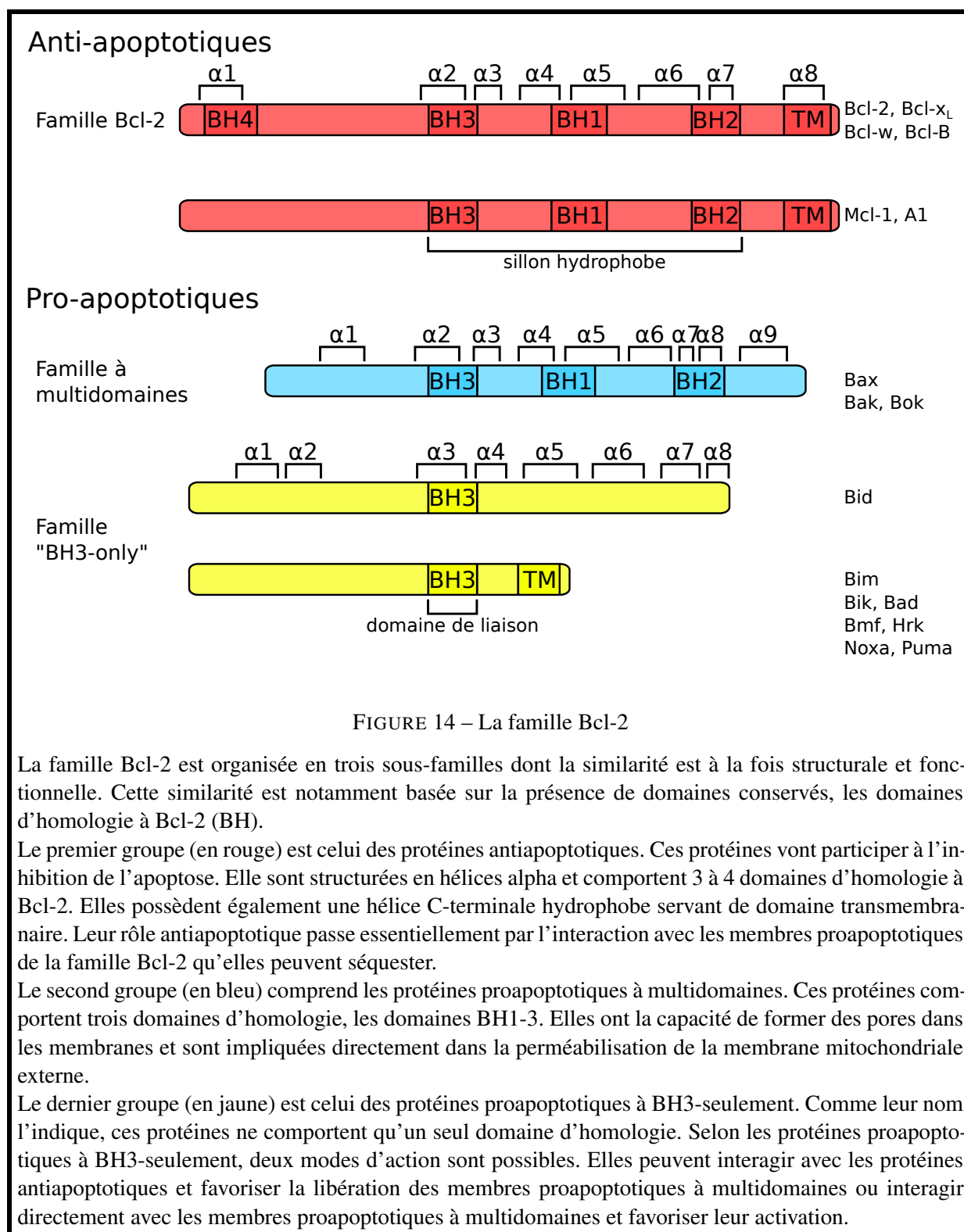
#### 3.1.1 Structures et fonctions au cours de l'apoptose

Les protéines de la famille Bcl-2 sont des protéines de taille moyenne (150 à 250 kDa) structurées en hélices alpha. Leur regroupement est réalisé sur la base d'une similarité de séquence et de fonction. Ainsi on compte entre un et quatre domaines d'homologie à Bcl-2 (BH ou Bcl-2 homology domain) qui définissent trois sous-familles aux fonctions globalement conservées. (Figure 14)

Les domaines d'homologie BH1, BH2 et BH3 forment une poche hydrophobe (Muchmore *et al.*, 1996) critique pour les interactions entre les membres de la famille (Zha *et al.*, 1996; Sattler *et al.*, 1997).

Les domaines BH1 et BH2 sont plus particulièrement impliqués dans la reconnaissance et la mise en place de ces interactions, notamment en interagissant avec le domaine BH3 des protéines partenaires. Des mutations ciblées dans les domaines BH1 et BH2 sont à même d'abolir ces interactions. Ainsi les mutants G145A (BH1) et W188A (BH2) de Bcl-2 (Yin *et al.*, 1994), G138A, G148E et G159A (BH1) de Bcl-x<sub>L</sub> (Sedlak *et al.*, 1995) sont incapables de fixer Bax. Le variant G108V (BH1) de Bax n'est plus capable de s'homodimériser (Meijerink *et al.*, 1998).

Le domaine BH3 (Figure 15) est souvent décrit comme correspondant au motif LXXXGDE. D'une manière plus générale, en prenant en compte la variabilité de certains des résidus (notamment la glycine peut être substituée par d'autres petits acides aminés comme l'alanine et la sérine et le glutamate est



fréquemment substitué par un aspartate ou même par des résidus chargés positivement), on peut définir la séquence suivante :



où  $\Phi$  représente un acide aminé hydrophobe (leucine, isoleucine, phénylalanine, valine...),  $\Sigma$  un petit acide aminé (glycine, alanine, sérine),  $Z$  un acide aminé chargé, le plus souvent négativement (aspartate, glutamate), bien que d'autres résidus puissent être substitués (lysine pour Noxa, glutamine pour Bmf et leucine pour Beclin-1) et enfin  $\Gamma$  un acide aminé hydrophile (asparagine, aspartate...) (Day *et al.*, 2008). Généralement ce domaine est peu structuré chez les protéines à BH3-seulement en solution alors qu'il présente une organisation en hélice  $\alpha$  prononcée lors de l'interaction avec les membres antiapoptotiques de la famille (Hinds *et al.*, 2003). Cette propension à former une structure hélicoïdale semble corrélée avec l'intensité de l'interaction (Petros *et al.*, 2000)

|         |        |          |   |   |        |   |   |        |          |   |   |        |          |
|---------|--------|----------|---|---|--------|---|---|--------|----------|---|---|--------|----------|
|         |        |          |   |   | L      | X | X | X      | G        | D | E |        |          |
|         | $\Phi$ | $\Sigma$ | X | X | $\Phi$ | X | X | $\Phi$ | $\Sigma$ | D | Z | $\Phi$ | $\Gamma$ |
| mBmf    | I      | A        | R | K | L      | Q | C | I      | A        | D | Q | F      | H        |
| mBid    | I      | A        | R | H | L      | A | Q | I      | G        | D | E | M      | D        |
| hBim    | I      | A        | Q | E | L      | R | R | I      | G        | D | E | F      | N        |
| mBad    | Y      | G        | R | E | L      | R | R | M      | S        | D | E | F      | E        |
| mPuma   | I      | G        | A | Q | L      | R | R | M      | A        | D | D | L      | N        |
| hNoxa   | C      | A        | T | Q | L      | R | R | F      | G        | D | K | L      | N        |
| mNoxa B | E      | C        | A | Q | L      | R | R | I      | G        | D | K | V      | N        |
| mNoxa A | F      | A        | A | Q | L      | R | K | I      | G        | D | K | V      | Y        |
| Beclin  | L      | S        | R | R | L      | K | V | T      | G        | D | L | F      | D        |
| hBax    | L      | S        | E | C | L      | K | R | I      | G        | D | L | F      | D        |
| mBax    | L      | S        | E | C | L      | R | R | I      | G        | D | L | F      | D        |
| hBak    | V      | G        | R | Q | L      | A | I | I      | G        | D | D | I      | N        |
| mBak    | V      | G        | R | Q | L      | A | L | I      | G        | D | D | I      | N        |
| hBcl-2  | V      | H        | L | T | L      | R | Q | A      | G        | D | D | F      | S        |
| hBcl-x  | V      | K        | Q | A | L      | R | E | A      | G        | D | E | F      | E        |

FIGURE 15 – Alignement des domaines BH3 des principaux membres de la famille Bcl-2

Comme décrit précédemment, le BH3 des protéines proapoptotiques est reconnu par la poche hydrophobe formée par les domaines BH1, BH2 et BH3 de leurs partenaires. Le mutant du BH3 Bax G67R n'interagit plus avec Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub> (Meijerink *et al.*, 1998).

Le domaine BH4, propre aux protéines antiapoptotiques, est essentiel à leur propriétés. Ce domaine est interchangeable entre Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub> (mais pas avec la partie N-terminale de Bax) sans perte de fonction. Lorsque le BH4 est supprimé des protéines Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub>, celles-ci perdent leur rôle anti-apoptotique (Huang *et al.*, 1998). Bien que cette observation ne soit pas systématique, plusieurs équipes ont rapporté l'importance du BH4 (par mutation ou clivage) dans l'interaction avec Bax et la promotion de la survie cellulaire (Hirotsu *et al.*, 1999). Le BH4 seul, fusionné à un peptide de la protéine TAT du virus VIH afin de faciliter son entrée dans la cellule, est capable de réprimer la mort (Shimizu *et al.*, 2000). Certaines observations rapportent même une inversion de fonction des protéines antiapoptotiques acquérant une capacité proapoptotique lors du clivage de leur BH4, tel que par exemple Bcl-x<sub>L</sub> par la caspase 3 (Bañez *et al.*, 2001).

L'ensemble de ces données suggère un rôle régulateur fort de ce domaine et apportent des éléments expliquant l'opposition de fonction entre les membres anti- et proapoptotiques de la famille Bcl-2 alors même que ces protéines possèdent une organisation structurale très proche.

Récemment une étude a mis en évidence une séquence d'homologie correspondant à la zone du BH4, dont la définition est moins restrictive que celle du BH4, et étant présente chez tout les membres à multidomaines. Cette séquence est définie ainsi :

$$\phi_1\phi_2XX\phi_3\phi_4$$

Les résidus  $\phi$  correspondant à des acides aminés hydrophobes avec un acide aminé aromatique en position  $\phi_3$  (Kvansakul *et al.*, 2008). En raison de l'absence d'éléments expérimentaux démontrant sa pertinence biologique cette définition ne sera pas utilisée ici pour désigner le domaine BH4.

**3.1.1.1 Les membres antiapoptotiques de la famille Bcl-2** Parmi les membres de cette sous-famille on trouve les protéines Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> (Bcl-2 -related gene long isoform), Mcl-1 (myeloid cell leukemia 1), Bcl-w et A1 (Bcl-2 related gene A1) qui possèdent quatre domaines d'homologie, les domaines BH1, BH2, BH3 et BH4 (excepté Mcl-1 qui ne possède pas le BH4) ainsi qu'une hélice  $\alpha$  C-terminale hydrophobe transmembranaire (excepté A1). Ces protéines ont un rôle inhibiteur sur les membres proapoptotiques de la famille Bcl-2.

**Bcl-2** est essentielle lors du développement embryonnaire. Bien que des souris Bcl-2<sup>-/-</sup> soient viables, leur survie est très fortement affectée par des déficiences du système lymphatique (dégénérescence du thymus et de la rate) et par une polykystose rénale (Veis *et al.*, 1993). Cet effet est principalement dû à la protéine à BH3-seulement Bim et la perte d'un allèle de Bim restaure un phénotype sain (Bouillet *et al.*, 2001). Cette observation donne un premier exemple montrant l'importance des protéines antiapoptotiques de la famille Bcl-2 dans la régulation de ses membres proapoptotiques.

Bcl-2, comme la plupart des protéines antiapoptotiques de la famille possède une hélice  $\alpha$  C-terminale hydrophobe lui permettant de s'ancrer dans les membranes biologiques (Nguyen *et al.*, 1993) telles que la membrane nucléaire, le réticulum endoplasmique et la membrane mitochondriale externe (Krajewski

*et al.*, 1993; Nguyen *et al.*, 1993). Il a été montré qu'elle peut interagir avec de nombreuses protéines proapoptotiques de la famille telles que la protéine Bax (Oltvai *et al.*, 1993).

**Bcl-x<sub>L</sub>** (BCL2L1) est critique pour le bon déroulement de la neurogenèse et de l'hématopoïèse. Des souris Bcl-x<sub>L</sub><sup>-/-</sup> ne terminent pas leur développement embryonnaire qui dégénère au treizième jour (stade 13.5) (Motoyama *et al.*, 1995). Sa structure est très proche de celle de Bcl-2 mais quelques différences structurales vont influencer sur son rôle et son mécanisme d'action. Tout comme Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> possède dans son segment transmembranaire des résidus chargés positivement assurant sa localisation membranaire. Il y en a cependant un plus grand nombre chez Bcl-x<sub>L</sub> (trois de plus avant l'hélice et un de plus après) et ceci est suffisant à assurer un adressage spécifique vers la mitochondrie (Kaufmann *et al.*, 2003). Par ailleurs, la substitution de ce segment transmembranaire par l'hélice  $\alpha$ 9 de Bax (variant S184V) afin de forcer une localisation mitochondriale modifie le comportement de Bcl-2 (perte de sa fonction antiapoptotique) mais pas celle de Bcl-x<sub>L</sub> (Liu *et al.*, 2007).

**Bcl-w** (BCL2L2) possède des caractéristiques de différents membres de la famille Bcl-2. Elle possède sensiblement les mêmes partenaires que Bcl-x<sub>L</sub> et une de leurs principales différences se retrouve au niveau des tissus d'expression. Alors que l'absence de Bcl-x<sub>L</sub> est létale, des souris Bcl-w<sup>-/-</sup> sont viables. Cependant les mâles sont stériles en raison d'un défaut de spermatogenèse (Print *et al.*, 1998). Tout comme Bax son hélice C-terminale est ancrée dans la poche hydrophobe formée par ses domaines BH1-3 (Denisov *et al.*, 2003) ce qui lui confère une localisation principalement cytosolique. Il semble que, lors de l'induction de l'apoptose, cette hélice soit libérée par une interaction avec Bim et entraîne son insertion membranaire et l'inhibition de son rôle antiapoptotique (Wilson-Annan *et al.*, 2003). Par ailleurs elle pourrait intervenir dans l'interaction avec les autres membres de la famille, sa suppression éliminant toute activité antiapoptotique (Hinds *et al.*, 2003).

**Mcl-1** (BCL2L3) a été mise en évidence dans la lignée ML-1 (leucémie myéloïde) comme un des facteurs oncogéniques responsables de leur état (Kozopas *et al.*, 1993). Sa présence est requise lors du développement embryonnaire et des souris ne possédant pas le gène arrêtent leur développement au stade blastocyste. Mcl-1 est fréquemment surexprimée dans les tumeurs et serait impliquée dans la résistance à un certain nombre de traitements anticancéreux ciblant les protéines de la famille Bcl-2 (Certo *et al.*, 2006).

La protéine a une organisation N-terminale très différente des autres membres antiapoptotiques de la famille Bcl-2. D'une part ce domaine est beaucoup plus long, il représente environ la moitié de la protéine (170 des 350 résidus) et les seules structures de la protéine déterminées à ce jour le sont sans ce domaine. D'autre part il ne comporte pas de BH4 mais de multiples séquences PEST, des sites de clivage par les caspases, de phosphorylation et d'ubiquitinylation (Thomas *et al.*, 2010). Ces éléments peuvent expliquer la faible demi-vie de Mcl-1 dans certains contextes cellulaires.

**Bfl1** ou A1 chez la souris (BCL2L5) est une cible transcriptionnelle du facteur de survie NF- $\kappa$ B. Son expression est induite par des stimuli apoptotiques tels que le TNF- $\alpha$  (Zong *et al.*, 1999) ou la staurosporine (Karsan *et al.*, 1996) ce qui en fait un des acteurs impliqués dans la résistance aux traitement

anticancéreux. Tout comme Mcl-1, Bfl-1 diffère structurellement des autres protéines antiapoptotiques de la famille Bcl-2 par l'absence du domaine régulateur BH4 (Choi *et al.*, 1995). Bfl-1 est mitochondriale et sa localisation dépend de son hélice C-terminale (Simmons *et al.*, 2008). Son rôle sur la protéine proapoptotique Bax est encore controversé. En effet certains auteurs rapportent une interaction entre Bfl-1 et Bax (Sedlak *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2000) alors que d'autres ne trouvent aucune interaction (Holmgreen *et al.*, 1999). Simmons *et al.* ont montré qu'un variant de Bax étiqueté FLAG, mais pas la forme endogène de Bax, interagit avec Bfl-1 (Simmons *et al.*, 2008). L'interaction avec la protéine proapoptotique Bak semble en revanche plus claire (Holmgreen *et al.*, 1999; Simmons *et al.*, 2008). Ainsi la présence d'A1 protège de l'apoptose induite par la staurosporine dans des cellules rénales murines dépourvues de Bax mais pas dans des cellules sans Bak (Degenhardt *et al.*, 2002).

### 3.1.1.2 Les membres proapoptotiques à multidomaines

**Bax** est le membre le plus étudié de la famille à multidomaine. Tout comme Bak, sa fonction principale est la formation de pores dans la membrane mitochondriale externe. La protéine est nativement cytosolique et doit subir un certain nombre de changements de conformation pour être relocalisée et s'insérer dans la membrane mitochondriale externe puis pour y former des oligomères. Le détail des caractéristiques de Bax et de sa régulation seront abordés en détail dans la partie suivante.

**Bak** est un membre à multidomaine de la famille Bcl-2 dont la fonction est en partie redondante avec celle de Bax (Farrow *et al.*, 1995; Chittenden *et al.*, 1995; Kiefer *et al.*, 1995). Des souris Bax<sup>-/-</sup> ou Bak<sup>-/-</sup> sont viables alors que la combinaison des deux suppressions est létale (Lindsten *et al.*, 2000). Toutefois les deux protéines ne sont pas strictement redondantes. D'un point de vue biochimique Bax et Bak présentent d'importantes différences. Tout d'abord la localisation de Bak est constitutivement mitochondriale. Cependant cette forme est inactive et, tout comme pour Bax, un mouvement de l'extrémité N-terminale semble requis pour son activation (Griffiths *et al.*, 1999). Son état inactif est en partie maintenu par une interaction avec les protéines anti-apoptotiques Bcl-x<sub>L</sub> et Mcl-1 (Cuconati *et al.*, 2003; Willis *et al.*, 2005) ou avec VDAC2 (Cheng *et al.*, 2003). tBid peut favoriser l'oligomérisation de Bak (Wei *et al.*, 2000). Le BH3 de Bak semble directement impliqué dans la formation des oligomères (Dewson *et al.*, 2008; Oh *et al.*, 2010) ainsi que son hélice  $\alpha_6$  (Dewson *et al.*, 2009).

**Bok** (Bcl-2-related ovarian killer) a été identifiée par un crible génétique d'une banque d'ADN complémentaires d'ovaires de rat dans lesquels la protéine antiapoptotique Mcl-1 est surexprimée. Son interaction avec Mcl-1 et Bfl-1 (mais pas avec Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> ou Bcl-w) a été détectée en double hybride chez la levure. L'analyse de différents tissus de rat montre que Bok est principalement exprimée dans les tissus reproducteurs. Sa surexpression induit la mort des cellules (Hsu *et al.*, 1997a). Le déclenchement de l'apoptose semble favoriser la localisation de Bok dans les fractions membranaires et son oligomérisation (Gao *et al.*, 2005); cependant la faible quantité de données expérimentales concernant Bok fait que son rôle exact et ses mécanismes d'action sont à ce jour mal connus.

Les membres proapoptotiques à BH3-seulement ne possèdent qu'un seul domaine d'homologie avec autres protéines de la famille, le domaine BH3. Ils participent à la régulation des autres membres de la famille et possèdent deux principaux mécanismes d'action. Les activateurs directs peuvent promouvoir l'activation et l'oligomérisation de Bax et Bak et donc la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe par une interaction directe avec elles. Les dérépresseurs peuvent interagir avec les protéines antiapoptotiques et par compétition libérer un membre proapoptotique d'une interaction inhibitrice. Ces deux mécanismes ne sont pas exclusifs et une même protéine à BH3-seulement peut agir selon les deux mécanismes.

Le point clé des régulations entre les membres de la famille est la capacité de former des interactions. Comme cela est décrit précédemment ces interactions font intervenir les domaines d'homologie et selon les variations de séquence, l'affinité au sein d'un couple donné ne sera pas la même. Cette spécificité définira un panel d'interactions possibles et sera cruciale aux mécanismes d'action des protéines à BH3-seulement (Chen *et al.*, 2005; Certo *et al.*, 2006). Généralement le domaine BH3 est responsable du rôle des proapoptotiques à BH3-seulement et des peptides correspondant à ce domaine ou des molécules mimétiques peuvent être suffisants à reproduire leur action.

Ces protéines, bien qu'ayant chacune une spécificité d'action propre, possèdent des redondances dans leur panel général d'interactions. Ceci résulte en le fait qu'aucune n'est réellement indispensable comme le montrent les modèles murins dépourvus individuellement de protéines à BH3-seulement. Tous sont viables et les déficiences induites ne sont liées qu'à des types cellulaires ou des inducteurs de l'apoptose particuliers.

**3.1.1.3 Les membres proapoptotiques à BH3-seulement activateurs** Les principaux activateurs de la famille sont Bid, Bim et PUMA. Tous peuvent interagir directement avec Bax ou Bak *via* leur domaine BH3 (Cartron *et al.*, 2004; Harada *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006b).

**Bid** est identifiée par l'équipe de Korsmeyer (BH3-interacting domain death agonist) en 1996 comme une protéine à la fois capable d'interagir avec Bcl-2 et Bax. Ils montrent que Bid seule est suffisante à induire l'apoptose, que cet effet est dépendant du domaine BH3 et de l'interaction avec la poche hydrophobe de Bax mais pas celle de Bcl-2. La localisation de la protéine est distribuée entre le cytosol et la membrane mitochondriale externe (Wang *et al.*, 1996) Deux ans plus tard il est mis en évidence qu'il existe deux formes de Bid, la forme native cytosolique et une forme clivée au niveau de l'aspartate 60 (nommé t-Bid pour truncated Bid) mitochondriale. Ce clivage est réalisé par la caspase 8 après stimulation du récepteur Fas. Cette observation met pour la première fois en évidence un lien direct entre la voie extrinsèque et la voie intrinsèque (Li *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998). Cette activation de Bid peut également être réalisée par clivage au niveau de l'aspartate 75 par le granzyme B (Barry *et al.*, 2000) ou par clivage au niveau de la glycine 70 ou l'arginine 71 respectivement par les calpaïnes (Chen *et al.*, 2001a) ou les cathepsines (Stoka *et al.*, 2001). La forme tronquée de Bid est suffisante à entraîner l'activation et la relocalisation de Bax vers la mitochondrie (Desagher *et al.*, 1999; Eskes *et al.*, 2000). La présence de multiples sites de clivages associée à une variété de protéases permettant l'élimination de la partie N-terminale de Bid suggère un rôle critique de ce fragment dans la régulation de l'activité proapoptotique de la protéine.

D'un point de vue structural Bid est un membre particulier des protéines à BH3-seulement. C'est en effet la seule protéine de cette sous-famille à posséder une structure en solution (Chou *et al.*, 1999; McDonnell *et al.*, 1999). À l'inverse, d'autres membres comme Bim, Bad et Bmf sont globalement non structurés et n'acquièrent une structure en hélices  $\alpha$  que lorsqu'ils interagissent avec des partenaires de la famille Bcl-2 (Hinds *et al.*, 2007). Sa structure est similaire à celle de Bax et Bcl-x<sub>L</sub> et les protéines, relativement proches d'un point de vue phylogénique, pourraient avoir une origine identique (Aouacheria *et al.*, 2005).

Les hélices  $\alpha$ 6-8 de Bid participent à l'ancrage de la forme tBid dans la membrane mitochondriale externe sans toutefois constituer un segment transmembranaire (Garcia-Saez *et al.*, 2004; Gong *et al.*, 2004; Oh *et al.*, 2005). La partie N-terminale tronquée jouerait ainsi un rôle régulateur de cet adressage en masquant les domaines d'interaction avec la membrane.

Il a été mis en évidence un rôle privilégié des cardiolipides dans cette localisation ne dépendant pas uniquement des propriétés acides de ce phospholipide, le phosphatidylglycérol et l'acide phosphatidique ne pouvant être substitués (Lutter *et al.*, 2000). En particulier cette spécificité d'interaction pourrait favoriser la présence de tBid au niveau des sites de contact entre les membranes mitochondriales interne et externe et le recrutement de Bax à proximité des extrémités des crêtes mitochondriales (Lutter *et al.*, 2001). Bid et la caspase 8 peuvent par ailleurs être recrutés au niveau des sites de contact par une interaction spécifique avec les cardiolipides (Gonzalvez *et al.*, 2008).

tBid est responsable d'un changement de conformation activateur de Bax (Desagher *et al.*, 1999; Eskes *et al.*, 2000; Lovell *et al.*, 2008) ou Bak (Wei *et al.*, 2000) conduisant à leur oligomérisation dans la membrane mitochondriale externe.

**Bim** (Bcl-2 interacting mediator of cell death) a été identifiée comme une protéine capable d'interagir avec Bcl-2. Elle possède une extrémité C-terminale hydrophobe lui permettant de s'insérer dans les membranes biologiques. Elle a ainsi une localisation similaire à celle de Bcl-2, et ce même dans le cas d'un variant incapable d'interagir avec elle (Bim $\Delta$ BH3). Il existe trois formes majeures de Bim résultant d'un épissage alternatif. Bim<sub>S</sub> la forme la plus courte (110 acides aminés) est également la plus pro-apoptotique ; Bim<sub>L</sub> (138 résidus) et Bim<sub>EL</sub> (198 résidus) possèdent une partie N-terminale plus longue. Une surexpression de Bim déclenche la mort et est inhibée par une surexpression conjointe de Bcl-2 (O'Connor *et al.*, 1998)

Comme cela a été décrit précédemment, le phénotype de souris Bcl-2<sup>-/-</sup> est compensé par la suppression d'un allèle de Bim, démontrant le lien fort existant entre les deux protéines. Des souris Bim<sup>-/-</sup> possèdent des défauts de l'homéostasie hématopoïétique, notamment une accumulation de cellules lymphoïdes et myéloïdes, ainsi qu'une atteinte autoimmune des reins (Bouillet *et al.*, 1999).

Bim est également un partenaire direct de Bax et entraîne son activation. Cette interaction est abrogée par la phosphorylation de Bim sur les sérines 55, 65 et 100 (Harada *et al.*, 2004). En 2008 un nouveau modèle d'interaction entre Bax et Bim est proposé grâce à l'utilisation de peptides BH3 stabilisés en hélices  $\alpha$  (SAHB, stabilized alpha helix BH3). Cette approche *in vitro* par spectroscopie RMN a permis de mettre en évidence une zone d'interaction au niveau de la face de Bax exposant les hélices  $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 6 associée à une libération de l'hélice  $\alpha$ 1 (détection par l'anticorps conformationnel 6A7) et une

oligomérisation de Bax (Gavathiotis *et al.*, 2008).

**Puma** (p53 upregulated mediator of apoptosis) a été identifiée en 2001 à la fois comme la cible transcriptionnelle du facteur p53 et comme une protéine partenaire de Bcl-2. PUMA est mitochondriale et peut interagir avec les protéines antiapoptotiques Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub> *via* son domaine BH3. Le contrôle de Puma est principalement transcriptionnel, son niveau d'expression basal est relativement faible et augmente fortement lors de l'induction de l'apoptose (Nakano et Vousden, 2001; Yu *et al.*, 2001).

Le rôle de Puma est généralement défini comme celui d'une protéine à BH3-seulement dérépresseur, pouvant interagir avec les protéines antiapoptotiques et libérer Bax, Bak ou les protéines à BH3-seulement activatrices. Tout comme Bim, Puma a une très forte affinité pour les protéines antiapoptotiques Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl-1 et A1 (Chen *et al.*, 2005). Puma est capable de libérer Bax par compétition pour le site de fixation sur Bcl-x<sub>L</sub> (Ming *et al.*, 2006) Cependant, dans cette étude, une répression de l'expression de Bcl-x<sub>L</sub> par ARN interférence ne suffit pas à déclencher l'apoptose dans un contexte Puma KO alors que les cellules meurent dans ces conditions en présence de la protéine à BH3-seulement.

Des preuves d'interaction et d'activation directe ont été obtenues. L'hélice  $\alpha$ 1 de Bax et le BH3 de Puma interagissent ce qui conduit à l'activation de Bax (Cartron *et al.*, 2004). Cette interaction a été confirmée *in vitro* par une approche de crible de peptides de Bax pouvant interagir avec Puma ainsi que par la capacité de Puma d'induire l'activation de Bax *in vivo* chez la levure ou dans des cellules de glioblastome (Gallenne *et al.*, 2009). D'autres auteurs ne voient pas d'interaction par coimmunoprécipitation entre Bax et Puma (Jabbour *et al.*, 2009). Toutefois il est possible que l'interaction entre Bax et Puma soit transitoire et ne puisse par conséquent pas être mise en évidence par cette méthode *in vivo*.

#### 3.1.1.4 Les membres proapoptotiques à BH3-seulement dérépresseurs

**Bik** est la première protéine à BH3-seulement à avoir été mise en évidence comme pouvant déclencher la mort par une interaction avec Bcl-2. Elle possède un segment transmembranaire et une capacité à être relocalisée vers la mitochondrie qui a laissé penser au départ qu'elle puisse agir de manière similaire à Bax et Bak (Boyd *et al.*, 1995). En interagissant avec Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> ou Bcl-w (mais pas avec Mcl-1), Bik peut libérer Bax et Bak d'une répression par ces protéines antiapoptotiques. Il semble toutefois que ceci ne soit pas toujours suffisant au déclenchement de l'apoptose dans certains modèles cellulaires en raison, par exemple, de la présence de la protéine Mcl-1 (Boyd *et al.*, 1995; Elangovan et Chinnadurai, 1997; Gillissen *et al.*, 2007).

Le rôle de Bik dans le déclenchement de l'apoptose serait également dû à sa capacité à entraîner une libération du calcium du reticulum endoplasmique ainsi qu'à un remodelage de la mitochondrie facilitant la relocalisation du cytochrome c, notamment *via* la dynamine Drp1 (Mathai *et al.*, 2005; Germain *et al.*, 2005).

**Bad** a été identifiée sur la base de sa capacité à interagir avec Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub>. Elle est en outre capable d'entraîner la libération de Bax par compétition en se liant à ces protéines antiapoptotiques (Yang *et al.*, 1995). Comme cela sera détaillé par la suite, Bad est principalement régulée par des phosphorylations qui modulent son affinité pour ses différents partenaires. Bad n'est pas essentielle mais la perte du

gène induit de graves troubles dont la formations de lymphomes chez la souris (Ranger *et al.*, 2003). À l'inverse la mutation des résidus phosphorylables de façon à assurer une activation constitutive de Bad n'entraîne pas de phénotype délétère majeur mais sensibilise les cellules à l'apoptose (Datta *et al.*, 2002) et dérégule la production de l'insuline, bien que ce mécanisme soit vraisemblablement indépendant de la fonction proapoptotique de Bad (Danial *et al.*, 2008). Ces données, parmi d'autres, suggèrent que Bad seule ne soit généralement pas suffisante pour déclencher l'apoptose et qu'il faille d'autres facteurs (notamment Noxa) afin d'activer fortement le processus de mort.

**Noxa** n'est, comme Bad, pas essentielle à la survie. Son absence de Noxa n'induit aucun phénotype chez la souris. Des cellules en cultures Noxa<sup>-/-</sup> présentent une légère résistance à l'apoptose (Villunger *et al.*, 2003). Noxa possède une spécificité de liaison des protéines antiapoptotiques complémentaire de celle de Bad. Elle n'interagit pas, par exemple, avec Bcl-x<sub>L</sub>. Cette différence dans le spectre d'interaction de Noxa résulte d'une séquence relativement différente du domaine BH3, notamment au niveau du motif IGDE, substitué en FGDK chez Noxa humaine (IGDK chez la souris). La restauration du motif consensus augmente artificiellement l'affinité de Noxa pour Bcl-x<sub>L</sub> d'un facteur 100. En parallèle une construction de Bim possédant le domaine BH3 de Noxa a une affinité spécifique pour Mcl-1 (Chen *et al.*, 2005). Cette spécificité d'interaction associée au faible potentiel proapoptotique de Noxa fait que la protéine est considérée comme un facteur sensibilisant à l'apoptose ou un régulateur fin de ses mécanismes plus que comme un facteur majeur de son déclenchement.

**Autres protéines** : Bmf interagit avec les protéines antiapoptotiques Mcl-1, Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> et Bcl-w. Elle peut également être séquestrée par le moteur myosine V en interagissant avec la protéine DLC2 (Puthalakath *et al.*, 2001). Sa fonction semble redondante avec celle de Bim dans différents modèles où seule la suppression des deux protéines entraîne un effet inhibiteur sur l'apoptose (Hübner *et al.*, 2010).

Hrk (Harakiri) peut interagir avec Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub> et potentiellement libérer les protéines proapoptotiques Bax et Bcl-x<sub>L</sub> (Inohara *et al.*, 1997). Hrk peut être membranaire (Inohara *et al.*, 1997). Elle pourrait interagir avec les membranes grâce à son hélice C-terminale (Bernabeu *et al.*, 2007).

#### 3.1.2 Régulations des membres de la famille Bcl-2

**3.1.2.1 Transcriptionnelles** Le contrôle génétique des protéines de la famille Bcl-2 joue un rôle important dans la régulation de l'apoptose. Le facteur de transcription NF-κB, activé par des signaux de survie, stimule l'expression des protéines antiapoptotiques Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> et A1 et réprime celle de Bax (Kucharczak *et al.*, 2003). Le facteur p53 active la transcription des protéines proapoptotiques Bax, Bid, Noxa et Puma et inhibe celle de Bcl-x<sub>L</sub> et Bcl-2 (voir partie sur p53). Alors que certains membres de la famille Bcl-2 subissent de nombreuses modifications post-traductionnelles, il semble que Puma et Noxa soient régulées principalement par la quantité de leurs transcrits.

Le facteur c-Myc joue un double rôle dans la cellule. C'est à la fois un inducteur de la prolifération cellulaire et de l'apoptose. Il favorise la transcription de Bax (Mitchell *et al.*, 2000) et réprime celle de Bcl-x<sub>L</sub> et Bcl-2 (Adams et Cory, 2007). Cependant en dépit de cette capacité d'activation de l'apoptose, c-Myc est souvent impliqué dans le processus de cancérisation (Adams et Cory, 2007). Des niveaux

élevés de Bcl-2 peuvent bloquer l'apoptose induite par c-Myc et sont responsables par exemple de lymphomes ou leucémies.

De nombreux facteurs de transcription peuvent modifier l'expression de la protéine antiapoptotique Mcl-1 (PU.1, FOXO, SP1...).

### 3.1.2.2 Modifications post-traductionnelles

**Phosphorylations** La phosphorylation est une réaction enzymatique catalysant l'ajout d'un groupement phosphate sur certains acides aminés des protéines. Les résidus les plus fréquemment phosphorylés sont les sérines, les thréonine puis les tyrosines. Les histidines et les aspartates peuvent également être phosphorylés bien que ce phénomène soit rencontré plutôt chez les procaryotes. Les enzymes catalysant la réaction de phosphorylation sont des protéines kinases. La séquence protéique environnant un résidu sur la protéine cible est souvent déterminante dans la reconnaissance et la prise en charge par une kinase et il est ainsi possible de caractériser des motifs de phosphorylation propres à une kinase donnée.

Une phosphorylation entraîne généralement un changement de conformation de la protéine en rendant par exemple polaire une zone hydrophobe.

La réaction inverse, l'hydrolyse de la fonction phosphate ou déphosphorylation, est catalysée par une protéine phosphatase.

On considère qu'environ un tiers des protéines eucaryotes est phosphorylé et environ la moitié des 500 kinases identifiées semblent impliquées dans des pathologies (Manning *et al.*, 2002).

De nombreuses protéines de la famille Bcl-2 sont régulées par phosphorylation.

Une phosphorylation peut moduler l'interaction entre des protéines. L'exemple le plus connu est le cas de la protéine proapoptotique Bad. Bad peut interagir avec Bcl-x<sub>L</sub> et inhiber sa fonction. Cette interaction a lieu au niveau du domaine BH3 de Bad, lequel comporte un site de phosphorylation au niveau de la sérine 155. Lorsque cette sérine est phosphorylée l'interaction avec Bcl-x<sub>L</sub> est rompue. D'autre part Bad possède sur l'autre face de la protéine deux sites de phosphorylation sur les résidus sérine 112 et 136, lesquels, une fois phosphorylés, permettent l'interaction inhibitrice avec les protéines de la famille 14-3-3 (Datta *et al.*, 2000). Un second exemple est celui de la protéine Bid dont des phosphorylations peuvent avoir lieu à proximité du site de clivage par les caspases (résidu thréonine 59 pour la protéine humaine, sérines 61 et 64 pour la protéine murine). Ces phosphorylations empêchent l'interaction avec les caspases, le clivage de Bid et donc son activation (Desagher *et al.*, 2001; Esposti *et al.*, 2003).

La phosphorylation peut favoriser la dégradation d'une protéine en diminuant sa stabilité ou en favorisant sa prise en charge par le protéasome. C'est par exemple le cas pour la protéine antiapoptotique Mcl-1 dont la phosphorylation par GSK-3 $\beta$  sur la sérine 159 induit la dégradation (Maurer *et al.*, 2006). De la même manière Bim-EL est dégradée par le protéasome lorsqu'elle est phosphorylée sur la sérine 69 par Erk1/2 (Luciano *et al.*, 2003). À l'inverse une phosphorylation peut participer à la stabilité d'une protéine. C'est le cas de la phosphorylation de la thréonine 163 de Mcl-1 (Domina *et al.*, 2004). La déphosphorylation de la sérine 87 de Bcl-2 conduit à sa dégradation par le protéasome (Breitschopf *et al.*, 2000).

Enfin une phosphorylation peut jouer directement sur la conformation ou les propriétés structurales d'une protéine. La protéine Bax possède ainsi plusieurs sites de phosphorylation (résidus sérine 163 et

184) lesquels pourraient participer à certains changements de conformation de la protéine et des propriétés physiques de certains domaines (libération de la partie N-terminale, de l'hélice  $\alpha 9$ , modulation de l'hydrophobicité de l'hélice  $\alpha 9$ ). Les données concernant Bax seront discutées plus en détail par la suite.

**L'ubiquitinylation** Cette modification post-traductionnelle consiste en la liaison covalente sur la protéine cible d'une ou plusieurs unités d'ubiquitine. L'ubiquitine est une petite protéine de 76 acides aminés (8,5 kDa), très conservée, présente chez les eucaryotes. Elle participe à la signalisation du devenir des protéines auxquelles elle est conjuguée. Il existe plusieurs types d'ubiquitinylation selon le nombre d'ubiquitine fixé et le type de liaisons mis en jeu et leurs conséquences seront différentes. La mono-ubiquitinylation consiste en la liaison d'une seule ubiquitine et participe généralement dans la signalisation et le trafic des protéines comme l'internalisation de récepteurs. La multi-mono-ubiquitinylation est la liaison de plusieurs monomères d'ubiquitine à différents endroits de la protéine cible. Enfin la poly-ubiquitinylation est la liaison de polymères d'ubiquitine. Selon le type de liaison intra-polymère la poly-ubiquitinylation résulte plutôt en le transport des protéines cible (liaisons K63) ou en l'adressage et la dégradation par le protéasome (liaisons K48).

À l'heure actuelle le rôle régulateur de l'ubiquitinylation mis en évidence dans la famille Bcl-2 concerne la signalisation vers le protéasome et la dégradation des protéines. Lors de dommages à l'ADN, Mcl-1 est ubiquitinylée par Mule (Mcl-1 ubiquitin ligase E3), dégradée par le protéasome, ce qui conduit au déclenchement de l'apoptose (Zhong *et al.*, 2005). Bcl-x<sub>L</sub> est ubiquitinylée par exemple lors de l'absence des protéines chaperon Hsp10 et Hsp60 (Shan *et al.*, 2003). Bcl-2 peut être ubiquitinylée en présence de cisplatine, un agent inducteur de l'apoptose. Il arrive cependant que des cellules deviennent résistantes à la mort induite par le cisplatine en produisant du monoxyde d'azote (NO). Il a été montré que le monoxyde d'azote pouvait participer à une modification post-traductionnelle de Bcl-2, la S-nitrosylation (modification d'un groupe thiol en S-nitrosothiol), laquelle inhibe l'ubiquitinylation de Bcl-2 et participe au maintien de la survie cellulaire (Chanvorachote *et al.*, 2006).

Enfin Bax peut également subir une dégradation ubiquitine-dépendante (Chang *et al.*, 1998; Li et Dou, 2000).

**La déamidation** Bcl-x<sub>L</sub> possède deux asparagines en position 52 et 66, dans sa longue boucle non structurée. La déamidation de ces résidus en aspartate induit une inhibition de sa fonction anti apoptotique (Deverman *et al.*, 2002).

**La myristoylation N-terminale** La myristoylation consiste en l'ajout d'un groupement myristoyl sur l'extrémité N-terminale d'une protéine. Généralement, un motif protéique particulier est présent et la liaison a lieu grâce à une N-myristoyltransférase sur une glycine N-terminale. Cette modification est réalisée au niveau du réticulum endoplasmique.

La protéine proapoptotique Bid possède un site de myristoylation sur sa forme clivée par les caspases (forme p15). La forme myristoylée de t-Bid lui permettrait d'être relocalisée plus facilement vers les membranes biologiques sans que la spécificité pour la membrane mitochondriale soit expliquée à ce jour (Zhang *et al.*, 2000)

**Le clivage** Comme cela a été détaillé précédemment, le clivage joue un rôle important dans l'activation de protéines de l'apoptose en permettant la transition entre une forme de préprotéine inactive et la forme active. C'est le cas des caspases ou dans la famille Bcl-2 de la protéine proapoptotique à BH3-seulement Bid dont l'extrémité N-terminale inhibitrice doit être clivée pour rendre accessible son domaine BH3.

Le clivage participe également à la régulation d'autres protéines de la famille Bcl-2. Les protéines antiapoptotiques sont structuralement proches des membres proapoptotiques de la famille. Elles possèdent une partie N-terminale contenant le domaine BH4 nécessaire au maintien de leur fonction antiapoptotique. Bcl-2 peut être clivée au niveau de l'aspartate 34 par la caspase 3 suite à un traitement de cellules par des radiations ionisantes, la liaison du ligand de Fas ou encore le retrait de l'interleukine 3. La partie C-terminale de la protéine exerce alors des propriétés proapoptotiques (Cheng *et al.*, 1997). Le fragment se comporte de façon similaire à la forme active de Bax et induit la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (Kirsch *et al.*, 1999).

Bcl-x<sub>L</sub> peut également être transformée en protéine proapoptotique par un clivage semblable au niveau des aspartates 61 et 76 de la boucle non structurée (Clem *et al.*, 1998). Le fragment C-terminal est capable de former des pores dans des liposomes (Basañez *et al.*, 2001).

Bax est clivée *in vivo* et *in vitro* par les calpaïnes après la glutamine 28 pour générer le fragment p18 dépourvu de l'extrémité régulatrice N-terminale. Comme il sera détaillé ultérieurement, l'extrémité N-terminale de Bax comporte une partie régulatrice inhibitrice, l'ART et une hélice  $\alpha$  impliquée dans l'adressage vers la mitochondrie. Cette forme clivée de Bax est constitutivement active et n'est pas inhibée par Bcl-x<sub>L</sub> (Toyota *et al.*, 2003)

## 3.2 Mécanismes de perméabilisation de la membrane externe

### 3.2.1 Le Mitochondrial Apoptosis Channel

Le mitochondrial apoptosis-induced channel (MAC) est un canal de la membrane mitochondriale externe dont la mise en place est réalisée lors de l'induction de la voie mitochondriale de l'apoptose (Pavlov *et al.*, 2001). Le MAC a une conductance de 3,3 à 4,5 nS, une taille de 3 à 6 nm et est voltage-indépendant. La présence d'au moins l'une des protéines proapoptotiques Bax ou Bak est requise pour la formation du canal. Par ailleurs, sa formation coïncide avec la présence d'oligomères de Bax et est abolie en présence de la protéine antiapoptotique Bcl-2 (Dejean *et al.*, 2005). Excepté une conductance supérieure, le MAC possède des caractéristiques très similaires à celle d'un pore formé par Bax. Cette observation indique que Bax puisse être modifiée *in vivo* ou que d'autres partenaires doivent intervenir pour augmenter la conductivité de canal (Martinez-Caballero *et al.*, 2009).

Le cytochrome c est un candidat idéal pouvant traverser le MAC. Le canal laisse en effet passer des molécules d'une taille comprise entre 10 et 17 kDa et a une sélectivité légèrement cationique (Guo *et al.*, 2004). La formation du MAC intervient très précocement lors de l'induction de l'apoptose et la relocalisation des autres facteurs mitochondriaux impliqués dans l'exécution de l'apoptose semblent se faire dans un second temps. La relocalisation de Smac/DIABLO (Adrain *et al.*, 2001), de l'AIF et EngoG (Arnoult *et al.*, 2003) peut être retardée en comparaison de celle du cytochrome c et semble dépendante

d'événements plus tardifs et notamment de l'activation de caspases.

### 3.2.2 Pores lipidiques

Le rôle exact de Bax et Bak dans la perméabilisation de la membrane externe est toujours soumis à débat. L'hypothèse du MAC attribue un rôle prépondérant à Bax dans la formation du pore induisant la libération des facteurs apoptogéniques mitochondriaux. Celle d'un pore lipidique serait en faveur d'une coopération étroite entre Bax et les lipides de la membrane externe. Bax agirait comme un facteur favorisant la déformation de la membrane et la formation de pores lipidiques. La présence de Bax dans une double couche plane de phospholipides altère sa stabilité en diminuant la tension linéaire de la couche de lipides à de faibles concentrations (100 pM) et déstabilisant fortement le double feuillet à des concentrations plus fortes (1 nM) (Basañez *et al.*, 1999). Dans cette vision le rôle de Bax serait de diminuer la barrière énergétique nécessaire à la formation spontanée de pores lipidiques dans la membrane.

L'équipe de Newmeyer utilise une approche *in vitro* visant à déterminer les composants essentiels à la formation de pores induite par Bax. En utilisant des liposomes générés à partir de lipides de la membrane mitochondriale externe, ils déterminent dans un premier temps que Bax en coopération avec tBid ou une forme préactivée et oligomérique de Bax peut entraîner la perméabilisation de ces liposomes et le passage de polymères de dextran d'une taille allant jusqu'à 2000 kDa. La perméabilisation est inhibée par la présence de la protéine antiapoptotique Bcl-x<sub>L</sub> mais surtout n'est pas observée avec des liposomes générés à partir de lipides du réticulum. La présence de cardiolipides semble un point important de la perméabilisation (Kuwana *et al.*, 2002). Ces résultats seront confirmés en 2009 par une approche de cryomicroscopie permettant de s'assurer de l'intégrité des liposomes au cours de l'expérimentation. Bax et tBid permettent la formation de pores dans la bicouche lipidique d'une taille de 25 à 100 nM. Le rôle des cardiolipides semble, dans ces observations, uniquement faciliter l'action de tBid mais pas celle de Bax. Les auteurs suggèrent que certaines protéines membranaires (non identifiées) ou la réorganisation des lipides dans des zones de concentration puisse suffire à la déformation de la membrane et la formation de pores (Schafer *et al.*, 2009).

D'autres travaux montrent que la composition lipidique de la membrane externe est un point clé de la perméabilisation induite par Bax. La présence de lysophosphatidylcholines, des lipides apportant une courbure positive à la membrane en raison de leur large tête hydrophile, favorise la formation de pores dans des liposomes en présence de Bax alors que des lipides ayant une courbure négative (diacylglycérol ou phosphatidyléthanolamine) diminuent cette propension (Basañez *et al.*, 2002). Le rôle des lipides apportant un degré de courbure négatif aux membranes a cependant été observé lors de la perméabilisation de liposomes induite par tBid (Epand *et al.*, 2002). La présence des deux types de lipides semble cependant nécessaire et dépendrait notamment de la taille des pores formés. Les lipides à degré de courbure négatif seraient principalement nécessaires à la formation de pores de petite taille (Garcia-Saez *et al.*, 2006).

En complément de la composition en lipides, l'observation d'une redistribution des lipides entre les feuillets interne et externe lors de la perméabilisation apporte un argument supplémentaire en faveur du rôle critique des lipides dans la formation d'un pore dans la membrane mitochondriale externe (Esposti *et al.*, 2001; Garcia-Saez *et al.*, 2006).



# La protéine proapoptotique Bax

I kissed thee ere I killed thee. No  
way but this, Killing myself, to die  
upon a kiss

William Shakespeare (1564–1616)

*Othello*

## Sommaire

|     |                                                                 |           |
|-----|-----------------------------------------------------------------|-----------|
| 1   | Données générales, relations structure-fonction . . . . .       | <b>59</b> |
| 1.1 | Adressage de Bax vers la mitochondrie . . . . .                 | 62        |
| 1.2 | Insertion et oligomérisation dans la membrane externe . . . . . | 67        |
| 2   | Rôle de la phosphorylation de Bax . . . . .                     | <b>69</b> |
| 2.1 | La voie Akt/PKB . . . . .                                       | 69        |
| 2.2 | La kinase GSK-3 $\beta$ . . . . .                               | 69        |
| 2.3 | Phosphorylation de Bax et contrôle de l'apoptose . . . . .      | 71        |

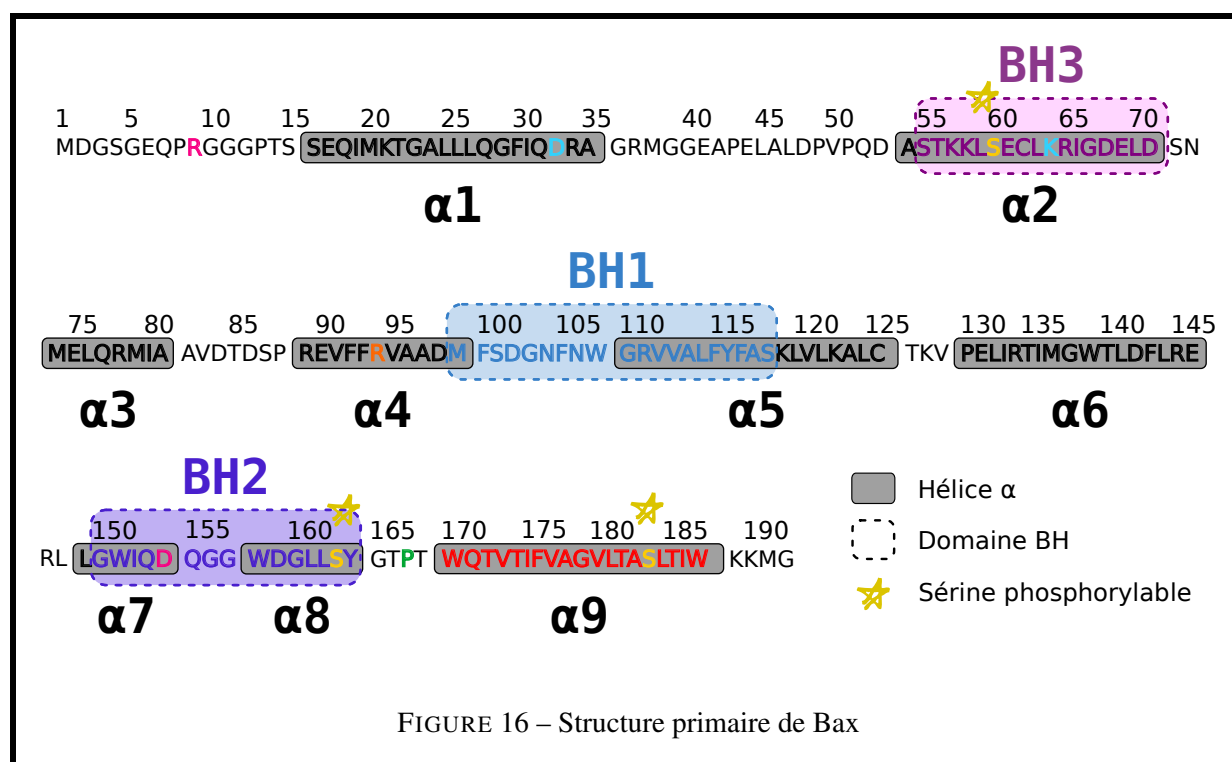
## 1 Données générales, relations structure-fonction

La protéine proapoptotique Bax est identifiée en 1993 par le groupe de Stanley J. Korsmeyer au cours d'une étude des partenaires de Bcl-2. Elle est baptisée Bax pour Bcl-2 associated X protein.

Bax est une des protéines de la famille Bcl-2 apparue le plus tardivement au cours de l'évolution. Elle est principalement présente chez les mammifères. Il n'en existe par exemple pas d'homologue chez *Caenorhabditis elegans*. On en retrouve un homologue relativement éloigné chez *Drosophila melanogaster*, plutôt proche de Bok : Dbok.

Chez l'homme, le gène codant pour Bax est localisé sur le chromosome 19 et organisé en 6 exons et 5 introns. La forme principale de la protéine, Bax  $\alpha$ , est une protéine de 21,2 kDa (192 acides aminés) et possède un point isoélectrique de 5,08. Sa structure primaire est présentée dans la figure 16. Selon les épissages ou la présence de mutations, d'autres isoformes de la protéine peuvent être rencontrées. L'isoforme Bax  $\beta$  possède une région supplémentaire entre le domaine BH2 et l'hélice C-terminale. Elle

est spontanément active et entraîne la libération du cytochrome c. Le domaine additionnel permet la régulation de l'isoforme  $\beta$  par le protéasome. Bax  $\gamma$  est une isoforme très courte correspondant aux 41 premiers acides aminés de Bax  $\alpha$  et sa fonction est à l'heure actuelle inconnue. La fonction de Bax  $\delta$ ,  $\epsilon$  et  $\omega$  est également inconnue. L'isoforme  $\sigma$ , dépourvue des acides aminés 159 à 171 (l'hélice  $\alpha 8$  et la boucle avant l'hélice  $\alpha 9$ ), possède des caractéristiques similaires à celles de Bax  $\alpha$ , avec toutefois une moindre susceptibilité à induire la mort en présence de certains agents (comme l'étoposide). Enfin Bax  $\psi$ , une isoforme dépourvue des 20 acides aminés N-terminaux, ne possède plus l'ART, un domaine de régulation, et est constitutivement active (ce point sera détaillé par la suite).



En 2000 la structure tridimensionnelle de la forme soluble globulaire et inactive de Bax  $\alpha$  est déterminée par RMN. Bax est globalement hydrophile. Cette structure met en évidence une organisation en neuf hélices  $\alpha$  (Figure 17). La plupart sont hydrophiles ou amphiphiles. Les hélices  $\alpha 5$  et  $\alpha 6$  et l'hélice C-terminale sont plutôt hydrophobes. L'hélice  $\alpha 9$  est ancrée dans une poche hydrophobe formée des domaines BH1-3 (Suzuki *et al.*, 2000).

La protéine possède des zones de flexibilité permettant la mobilité de certains domaines et d'éventuels changements de conformation. Ainsi la partie N-terminale de Bax est constituée d'une hélice  $\alpha$  de 20 acides aminés précédée d'une zone non structurée très mobile de 15 acides aminés. Cet ensemble est lui-même relié au reste de la protéine par une boucle flexible d'une vingtaine de résidus. L'hélice  $\alpha 1$  a été mise en évidence comme étant un signal d'adressage vers la mitochondrie (Cartron *et al.*, 2002). La partie N-terminale précédant cette hélice permet la stabilisation de cet ensemble et participe au maintien de Bax dans une conformation inactive.

Du côté C-terminal, l'hélice  $\alpha 9$  est susceptible de posséder une mobilité importante, toutefois plusieurs facteurs assurent à la protéine une certaine stabilité. Tout d'abord, la présence d'une proline en

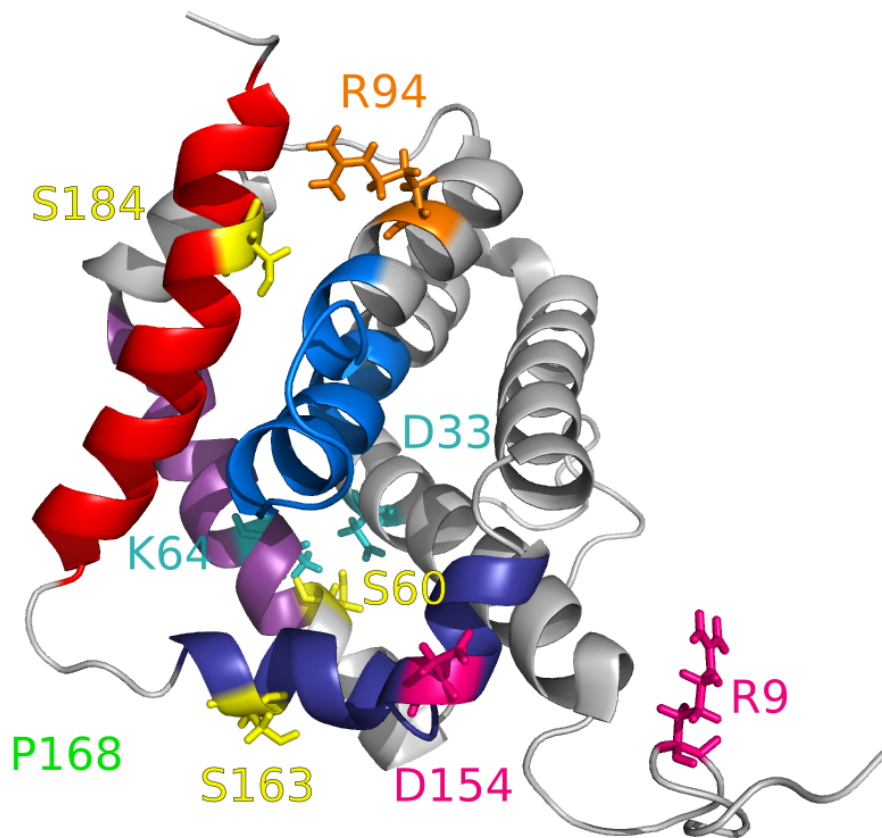


FIGURE 17 – Structure tertiaire de Bax

L'hélice  $\alpha 9$  est présentée en rouge. Les domaines BH1, BH2 et BH3 sont en bleu clair, bleu foncé et violet respectivement.

position 168, formant un coude entre les hélices  $\alpha 8$  et  $\alpha 9$ , diminue les degrés de liberté dans la mobilité de l'hélice C-terminale. D'autre part cette hélice est stabilisée en interagissant par sa face hydrophobe avec la poche hydrophobe formée par les domaines BH1-3. La mutation de la proline 168 en alanine, un petit acide aminé neutre et non coudé, rétablit une forte mobilité de l'hélice  $\alpha 9$  et semble suffisante à un changement important de conformation de la protéine puisque ce variant est fortement adressé vers la membrane mitochondriale et entraîne une relocalisation massive du cytochrome c vers le cytosol (Arokium *et al.*, 2004; Cartron *et al.*, 2005).

Tout comme c'est le cas pour Bcl-x<sub>L</sub>, les hélices  $\alpha 5$  et  $\alpha 6$  sont organisées en une structure en épingle à cheveux analogue des domaines membranaires de certaines toxines formant des pores, comme la toxine diphtérique (Muchmore *et al.*, 1996). Ces hélices sont aujourd'hui les principaux candidats pour participer à l'ancrage de Bax dans les membranes biologiques.

Les domaines présentés ici sont étroitement liés à la fonction de Bax. Lors de l'initiation de la voie intrinsèque de l'apoptose Bax est relocalisée vers la mitochondrie où elle peut s'insérer dans la membrane externe, former des oligomères et entraîner la perméabilisation de la membrane. Les paragraphes suivants

présentent les domaines de Bax participant tout d'abord à l'adressage de la protéine vers la mitochondrie puis ceux nécessaires à son insertion dans la membrane externe et à la formation d'oligomères impliqués dans la perméabilisation de la membrane.

## 1.1 Adressage de Bax vers la mitochondrie

Comme cela a été décrit précédemment, la forme native de Bax est cytosolique, globulaire et inactive (Hsu *et al.*, 1997b). Pour jouer son rôle proapoptique Bax doit être relocalisée vers la membrane mitochondriale externe. Les domaines impliqués dans la fonction de Bax sont majoritairement hydrophobes et restent enfouis au cœur de la protéine dans sa conformation cytosolique, il y a donc nécessité de changements de conformation importants pour qu'elle acquière sa forme active.

### 1.1.1 Rétention dans le cytosol

Plusieurs partenaires non mitochondriaux de Bax ont été mis en évidence. De telles interactions pourraient constituer un mécanisme de séquestration de Bax inhibant son rôle proapoptotique en l'empêchant de rejoindre la membrane mitochondriale.

La protéine 14-3-3 $\theta$ , déjà connue pour interagir avec la protéine proapoptotique à BH3-seulement Bad, peut séquestrer Bax dans le cytosol. L'interaction implique l'extrémité C-terminale de Bax et contrairement à Bad cette liaison n'est pas dépendante de l'état de phosphorylation de Bax. 14-3-3 $\theta$  est ainsi capable d'empêcher la relocalisation de Bax vers la mitochondrie et d'inhiber l'apoptose induite *via* le récepteur Fas. Cette inhibition peut être levée lors d'un clivage de 14-3-3 par les caspases ou encore par un mécanisme indépendant des caspases (résistant à l'inhibiteur des caspases zVAD-fmk) qui reste à être caractérisé. Les isoformes  $\zeta$ ,  $\epsilon$  et  $\varsigma$  de 14-3-3 peuvent également interagir avec Bax et pourraient participer à sa régulation selon un mécanisme similaire (Nomura *et al.*, 2003)

Un peptide antiapoptotique de 24 résidus, l'humanin (HN), exprimé dans les cellules de mammifères, est capable d'interagir avec Bax et d'inhiber sa relocalisation vers la mitochondrie en stabilisant la conformation de Bax pour laquelle l'hélice  $\alpha 9$  est ancrée dans le sillon hydrophobe (Guo *et al.*, 2003)

Le facteur de réparation de l'ADN Ku70, impliqué dans la réparation des cassures doubles brin de l'ADN, a également été identifié comme partenaire cytosolique de Bax. Les deux protéines peuvent interagir dans le cytosol réprimant l'activité proapoptotique de Bax. Lorsque Ku70 est acétylée sur son extrémité C-terminale cette interaction est rompue et Bax est relocalisée vers la mitochondrie (Cohen *et al.*, 2004; Subramanian *et al.*, 2005).

Les membres antiapoptotiques de la famille Bcl-2 ont également été considérés comme pouvant séquestrer Bax. Il est connu par exemple que Bcl-2 (Oltvai *et al.*, 1993; Yin *et al.*, 1994), Bcl-x<sub>L</sub> ou encore Bcl-w (Zhai *et al.*, 2008) peuvent interagir avec Bax et inhiber sa fonction. Cependant, étant donné le caractère membranaire de ces protéines, il paraît plus probable que ces interactions aient lieu au contact des membranes biologiques plutôt qu'en solution. Le réticulum endoplasmique où se retrouve par exemple Bcl-2 pourrait être un compartiment de séquestration de Bax.

### 1.1.2 Rôle des extrémités de Bax

**1.1.2.1 L'extrémité N-terminale possède un motif d'adressage** En 1998, une étude analysant l'adressage de Bax met en évidence pour la première fois un changement de conformation entre les formes cytosolique et membranaire de la protéine. L'induction de l'apoptose lors du retrait de l'interleukine 3 s'accompagne d'une relocalisation de Bax vers la mitochondrie. La protéine devient alors sensible à une protéolyse ménagée par la trypsine ou la protéinase K. La forme clivée ainsi obtenue n'est plus reconnue par un anticorps dirigé contre les résidus 11 à 30. Cette observation suggère un mouvement de la partie N-terminale de Bax lors de sa relocalisation vers la mitochondrie qui aurait conduit à l'exposition de ce domaine et à son clivage. Par la suite, une analyse de l'intégration de Bax sur mitochondries isolées en utilisant des protéines transcrites *in vitro*, met en évidence deux formes de la protéine. La forme entière n'est adressée qu'après traitement par un extrait cytosolique de cellules apoptotiques alors qu'une forme plus courte résultant d'une erreur de transcription et qui correspond à la protéine dépourvue des 19 résidus initiaux est constitutivement mitochondriale. Ces résultats conduisent à l'identification des 19 premiers résidus de Bax comme un motif de régulation de son adressage. Ce domaine est nommé ART pour apoptosis regulation of targeting (Goping *et al.*, 1998)

Le variant naturel Bax  $\psi$ , découvert chez des patients atteints de glioblastomes multiformes de bas grade, est dépourvu de ces 20 acides aminés initiaux. Sa présence résulte d'un défaut d'expression d'une partie de l'exon 1 du gène de Bax. Cette isoforme est principalement mitochondriale et induit une plus grande susceptibilité à l'apoptose. Cette isoforme exprimée dans la levure est active et entraîne la libération du cytochrome c (Cartron *et al.*, 2002, 2003)

L'ART constitue une séquence de régulation de l'adressage de Bax. Toutefois les résultats précédents n'expliquent pas selon quel mécanisme Bax est relocalisée vers la mitochondrie. La structure tridimensionnelle de la forme cytosolique de Bax avait mis en évidence une mobilité potentielle de toute la partie N-terminale de Bax comprenant l'ART et l'hélice  $\alpha 1$  (Suzuki *et al.*, 2000, Figure 18). Ce domaine est stabilisé par la présence d'une proline en position 13 et sa substitution par une valine conduit à l'activation de Bax (Cartron *et al.*, 2002). L'hélice  $\alpha 1$  est directement impliquée dans l'adressage de Bax vers la mitochondrie. En effet si la suppression de l'ART permet de stimuler la relocalisation mitochondriale de Bax, la suppression conjointe de l'hélice l'abroge, restaurant un phénotype inactif de la protéine. Par ailleurs, l'hélice  $\alpha 1$  seule ou avec l'ART mais pas l'ART seule, lorsqu'elle est couplée à la RFP, est capable de stimuler sa localisation mitochondriale *in vitro* (Cartron *et al.*, 2003). La substitution des deux prolines situées dans l'ART (prolines 8 et 13) par des glycines augmente artificiellement sa mobilité et favorise l'adressage mitochondrial de Bax humaine exprimée chez la levure (Arokium *et al.*, 2004). L'aspartate 33 et la lysine en position 64 participent à la stabilisation de l'extrémité N-terminale de Bax par une interaction ionique. La substitution de ces résidus chargés par des alanines empêche toute possibilité d'interaction et conduit à l'adressage de Bax, à la perméabilisation de la membrane externe et au déclenchement de l'apoptose. L'inversion de ces charges chez le mutant D33K-K64D restaure la stabilité de l'hélice  $\alpha 1$  et un phénotype sauvage de la protéine (Cartron *et al.*, 2005).

Le mouvement de la partie N-terminale de Bax joue donc un rôle primordial dans le contrôle de son adressage vers la mitochondrie. D'ailleurs cet événement est couramment utilisé comme indice expérimental de l'activation de Bax. La protéine est en effet reconnue par l'anticorps conformationnel 6A7

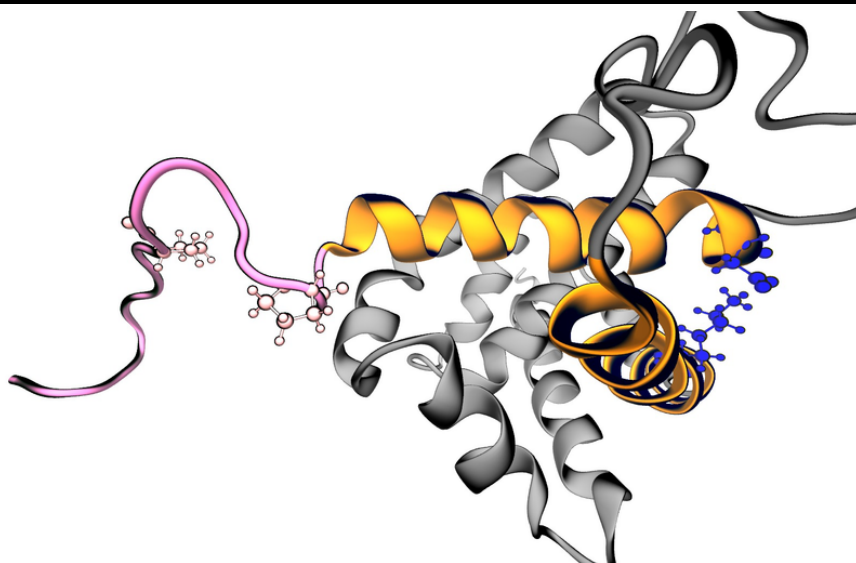


FIGURE 18 – Partie N-terminale de Bax

L'ART (en mauve) est la partie N-terminale de Bax qui intervient dans la régulation de son adressage vers la mitochondrie. Bien qu'elle soit très mobile, elle est stabilisée par la présence de deux prolines (P8 et P13 en rose). L'ART est suivie de l'hélice  $\alpha 1$  (en jaune) qui semble impliquée directement dans l'adressage de Bax vers la mitochondrie. Les hélices  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  sont stabilisées par l'interaction électrostatique entre l'aspartate 33 et la lysine 64.

(dirigé contre les résidus compris à la jonction de l'ART et de l'hélice  $\alpha 1$ ) dès lors que l'extrémité N-terminale a subi un changement de conformation (Peyerl *et al.*, 2007). Cette forme de Bax correspond très généralement, mais pas systématiquement, à la forme active de Bax, capable d'induire la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe.

Récemment l'hélice  $\alpha 1$  a été mise en évidence comme un site alternatif du domaine BH3 pour permettre l'interaction avec les protéines proapoptotiques à BH3 seulement Puma et Bid et Bim. L'interaction entre l'hélice  $\alpha 1$  de Bax et le BH3 de Bid ou celui de Puma a été détectée par une approche par résonance plasmonique de surface, par double hybride ou pull-down (Cartron *et al.*, 2004). L'interaction entre l'hélice  $\alpha 1$  de Bax et le BH3 de Bim a été mise en évidence par une approche RMN (Gavathiotis *et al.*, 2008).

**1.1.2.2 L'hélice  $\alpha 9$**  Par analogie avec les protéines antiapoptotiques Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub> dont l'hélice C-terminale est caractérisée comme étant un segment transmembranaire (Nguyen *et al.*, 1993; Priault *et al.*, 1999), l'hélice  $\alpha 9$  de Bax a initialement été considérée comme tel.

Les premières études du rôle de l'hélice  $\alpha 9$  ont utilisé des constructions dépourvues de ce segment ou chimériques. Ainsi la protéine de fusion GFP-Bax n'est plus relocalisée vers la mitochondrie lorsque l'hélice  $\alpha 9$  est absente (Wolter *et al.*, 1997). Ce résultat semble indiquer que l'hélice C-terminale est indispensable à l'adressage de la protéine de fusion. Cependant cette hélice seule est incapable d'induire la relocalisation de la GFP vers la mitochondrie (Nechushtan *et al.*, 1999). Des constructions chimériques échangeant les hélices C-terminales de Bax et Bcl-x<sub>L</sub> montrent également que l'hélice  $\alpha 9$  de Bax n'est

pas suffisante à son adressage *in vitro* et dans des cellules HL-60i. La substitution de l'hélice  $\alpha 9$  de Bax par l'hélice C-terminale de Bcl-x<sub>L</sub> permet l'adressage de la protéine chimère vers la mitochondrie. À l'inverse, Bcl-x<sub>L</sub> reste cytosolique lorsque l'on remplace cette hélice C-terminale par l'hélice  $\alpha 9$  de Bax (Tremblais *et al.*, 1999).

Cette observation a également été confirmée grâce à un système d'expression hétérologue de Bax chez *Saccharomyces cerevisiae*. La forme de Bax dépourvue de son hélice C-terminale est adressée à la mitochondrie et capable de perméabiliser la membrane externe (Priault *et al.*, 1999). Dans les mêmes conditions, une approche de mutagenèse dirigée montre que, bien que cette hélice ne soit pas indispensable à l'adressage de Bax, le fait de favoriser sa mobilité en remplaçant la proline à la jonction des hélices  $\alpha 8$  et  $\alpha 9$  par une alanine conduit à la relocalisation de Bax vers la mitochondrie et à la perméabilisation de la membrane externe. Par ailleurs, la substitution par un aspartate de la thréonine 174, située face à la cavité hydrophobe formée des domaines BH1-3, induit également l'activation de Bax en induisant une répulsion électrostatique avec le glutamate 69. La même substitution appliquée à des résidus exposés du côté externe de la protéine (F176D, V180D, A183D) n'a en revanche aucune conséquence sur Bax (Arokium *et al.*, 2004).

D'autres résidus de l'hélice  $\alpha 9$  sont impliqués dans l'activation de Bax. Par exemple la substitution de la sérine 184 par une valine entraîne une localisation constitutive à la mitochondrie (Nechushtan *et al.*, 1999). Ceci sera discuté de façon plus détaillée par la suite.

**1.1.2.3 Stabilisation et exposition des domaines terminaux** L'ensemble des résultats précédents montre que les deux extrémités de Bax sont impliquées dans le mécanisme d'adressage vers la mitochondrie. Plus précisément il est nécessaire que ces domaines soient exposés. Dans la conformation cytosolique inactive de la protéine, il semble que ces deux extrémités puissent interagir et participer à la stabilisation de l'ART. La structure tridimensionnelle de la forme soluble de Bax met en évidence la possibilité de l'existence d'une interaction électrostatique entre les résidus 9 (ART) et 154 (hélice  $\alpha 7$ ), respectivement une arginine et un aspartate. L'inversion de la charge d'un seul de ces deux résidus (mutants R9E et D154K) mais pas l'inversion des deux charges (mutant R9E-D154K) suffit à entraîner l'adressage et l'activation de Bax (Arokium *et al.*, 2007).

L'équipe d'Emily Cheng publie en 2009 une étude *in vitro* du rôle des parties N- et C-terminales de Bax. Leur approche est basée sur l'utilisation d'une part d'une fusion de la GST avec l'hélice  $\alpha 9$  de Bax et d'autre part d'une forme étiquetée (HA) et tronquée de Bax ( $\Delta N$  et/ou  $\Delta C$ ). Elle a consisté à déterminer si une interaction est possible entre ces deux constructions et quels sont les domaines exposés. Leurs résultats mettent en évidence que la mutation S184V empêche bien toute interaction de la fusion GST-hélice  $\alpha 9$  avec Bax $\Delta C$ . En outre la forme native de l'hélice  $\alpha 9$  n'est stabilisée dans la poche hydrophobe de Bax que si la partie N-terminale est présente. La construction GST-hélice  $\alpha 9$  n'interagit plus avec Bax $\Delta N\Delta C$ . Ainsi il apparaît que les mouvements de ces deux domaines pourraient être corrélés. Ils montrent par ailleurs que les protéines pro-apoptotiques à BH3-seulement tBid, Bim et Puma peuvent interagir avec l'hélice  $\alpha 1$  de Bax. Le modèle qui en découle est que la présence de ces protéines pourrait contribuer à la libération de l'hélice  $\alpha 1$  puis de l'hélice  $\alpha 9$  et favoriser l'adressage de Bax vers la mitochondrie (Kim *et al.*, 2009).

**1.1.2.4 Sensibilité de Bax à un changement de conformation** Dans de nombreux travaux de recherche, Bax n'est pas exprimée sous forme native mais étiquetée (étiquettes flag, HA, c-myc) ou fusionnée à une seconde protéine (GFP). Cette approche est réalisée dans le but de faciliter la détection de la protéine, aussi bien par des techniques utilisant des anticorps (immunodétection, immunoprécipitation) que par des techniques de biologie cellulaire (microscopie de fluorescence). Toutefois, comme cela est décrit précédemment, Bax est une protéine dont la conformation joue un rôle critique dans sa fonction et dont les extrémités participent grandement à sa régulation.

L'ajout d'une étiquette ou la fusion avec une autre protéine sont susceptibles d'entraîner ou d'empêcher des changements de conformation de Bax de façon artificielle. Par exemple l'ajout d'un tag c-myc déstabilise la protéine et conduit à son activation spontanée (Priault *et al.*, 2003). La GFP de par sa taille (27 kDa) pourrait également interférer dans les étapes d'insertion dans la membrane et d'oligomérisation.

*In vitro* de nombreux facteurs peuvent provoquer l'activation de Bax. Ainsi des détergents comme le Triton-X100 ou le NP40 (Hsu et Youle, 1998; Antonsson *et al.*, 2000), la température (une heure à 43°C) (Pagliari *et al.*, 2005) un pH élevé (supérieur à 7,6 ou 8,2) (Khaled *et al.*, 2001; Cartron *et al.*, 2004) ou très bas (inférieur à 6) entraînent une activation de Bax (Cartron *et al.*, 2004). Ces données soutiennent l'idée selon laquelle Bax est nativement stabilisée dans une conformation inactive mais possède une capacité intrinsèque de changer de conformation vers une forme activée, ce changement étant déclenché en présence de facteurs initiateurs.

### 1.1.3 Implication de récepteurs mitochondriaux

Les travaux de l'équipe de Korsmeyer en 1998 apportent un premier indice indiquant que certaines protéines mitochondriales permettraient l'adressage de Bax en jouant le rôle de récepteur. Bax n'est en effet plus adressée vers des mitochondries isolées traitées à la trypsine. Le traitement à la trypsine permet d'éliminer les domaines protéiques extramembranaires et pouvant servir de récepteur à Bax (Goping *et al.*, 1998).

L'équipe d'Andrews met en évidence le rôle de tBid dans l'adressage de Bax vers la membrane en montrant *in vitro* sur des liposomes que l'interaction entre les deux protéines n'a lieu qu'en présence de membranes. tBid est adressée vers les liposomes avant Bax et participe à son insertion dans la membrane puis à son oligomérisation. Enfin les oligomères de Bax permettent la perméabilisation des liposomes (Lovell *et al.*, 2008). Dans ces conditions l'adressage de Bax n'a lieu que lorsque tBid est présente dans la membrane. Ainsi il semble dans ce modèle d'étude que tBid joue un rôle direct dans l'adressage en agissant comme un récepteur.

L'interaction entre Bax et le canal VDAC a été détectée par coimmunoprécipitation (Narita *et al.*, 1998). Bien que le rôle de VDAC ait au départ été proposé comme participant directement dans la relocalisation du cytochrome c son implication a par la suite été réfutée (Priault *et al.*, 1999; Rostovtseva *et al.*, 2004) et il semble désormais clair que le VDAC ne participe pas directement à la perméabilisation de la membrane (Baines *et al.*, 2007).

Récemment l'implication de TOM22, un récepteur du complexe TOM, dans l'adressage de Bax vers la mitochondrie a été démontrée. Une approche de double hybride bactérien a pu mettre en évidence l'interaction entre Bax et TOM22. Par ailleurs des anticorps dirigés contre TOM22 ou l'inhibition de

l'expression de TOM22 diminuent l'adressage de Bax vers la mitochondrie et l'apoptose (Bellot *et al.*, 2007). L'adressage de la forme monomérique inactive de Bax serait non seulement favorisé par TOM22 mais également par la protéine composant le canal du complexe TOM : TOM40 (Cartron *et al.*, 2008). L'implication de TOM22 a été confirmée chez la drosophile où l'expression hétérologue de Bax murine voit son effet sur la libération du cytochrome c diminuer lors de la perte d'un des allèles du gène codant pour TOM22 ou pour TOM70 (Colin *et al.*, 2009). D'autres auteurs rapportent que la perte de TOM22, TOM70 ou TOM40 n'a aucune influence *in vitro* sur l'adressage de Bax recombinant vers la membrane de mitochondries isolées (Ross *et al.*, 2009). Cependant ces auteurs ont travaillé avec un mutant de Bax constitutivement mitochondrial : Bax S184V (Nechushtan *et al.*, 1999).

Enfin il semble que la forme membranaire de Bax puisse elle-même agir comme un récepteur pour la forme cytosolique. La préincubation de mitochondries avec tBid en présence d'une forme native de Bax rend possible l'adressage d'un mutant incapable d'interagir avec tBid (Cartron *et al.*, 2008).

## 1.2 Insertion et oligomérisation dans la membrane externe

### 1.2.1 Insertion

Il est désormais clair que Bax est relocalisée vers la mitochondrie et peut s'insérer dans la membrane externe. Trois des neuf hélices  $\alpha$  de Bax possèdent des propriétés hydrophobes en faisant de bons candidats pour expliquer l'ancrage de Bax à la mitochondrie : les hélices  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  et  $\alpha 9$ . Les résultats décrits précédemment montrent que l'hélice  $\alpha 9$  n'est pas indispensable à l'activité de Bax mais que l'augmentation artificielle de sa mobilité favorise son adressage et la perméabilisation de la membrane.

Une première approche utilisant des peptides montre que les hélices  $\alpha 5$  et  $\alpha 6$  de Bax ainsi que les domaines homologues chez Bcl-x<sub>L</sub> et Bid peuvent s'insérer dans des membranes dans un système artificiel (Nechushtan *et al.*, 1999)

Par la suite d'autres études montrent que les hélices  $\alpha 5$  et  $\alpha 6$  participent à l'insertion de Bax dans la membrane mitochondriale.

Le changement de conformation consécutif à l'exposition des extrémités de Bax entraîne également l'exposition d'une partie de l'hélice  $\alpha 5$  qui est alors accessible à l'anticorps TL41. Par ailleurs, alors qu'une mutation dans l'hélice  $\alpha 1$  (L26G) suffit à abolir l'adressage et l'insertion de Bax  $\alpha$  et du variant constitutivement actif Bax  $\psi$ , la substitution de 8 résidus des hélices  $\alpha 5$  et  $\alpha 6$  n'affecte pas l'adressage de ces deux formes de Bax mais empêche en revanche leur insertion dans la membrane, sa perméabilisation et la poursuite de l'apoptose (Cartron *et al.*, 2005).

L'équipe de David Andrews effectue en 2005 une analyse de l'organisation de Bax dans la membrane mitochondriale externe. En utilisant des mutants ponctuels de Bax possédant une cystéine à différents endroits stratégiques de la protéine et grâce au traitement par un agent chimique (l'IASD) il leur a été possible de déterminer la topologie de Bax dans la membrane. L'IASD est une molécule entraînant la modification des résidus cystéine en ajoutant deux charges négatives. La bicouche lipidique des membranes biologiques est imperméable à l'IASD. Ainsi, seuls les résidus n'étant pas inclus dans la membrane seront modifiés. La modification est détectable grâce au changement du profil de migration sur électrophorèse. Leurs résultats indiquent que seuls des résidus des hélices  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  et  $\alpha 9$  sont protégés d'une

modification par l'IASD mais pas des résidus du reste de la protéine, ni des extrémités de ces hélices ou de la boucle comprise entre les hélices  $\alpha 5$  et  $\alpha 6$ . Ceci suggère que ces trois hélices sont insérées dans la membrane (Annis *et al.*, 2005).

Le remplacement des principaux acides aminés chargés des hélices  $\alpha 5$  et  $\alpha 6$  par des alanines conduit à une insertion constitutive de Bax dans la membrane externe et suggère un rôle régulateur de ces résidus. Il est à noter qu'au delà d'un certain seuil de substitution des résidus chargés dans ces hélices (7 résidus dont l'arginine 109) Bax perd ses capacités cytotoxiques (Nouraini *et al.*, 2000).

### 1.2.2 Oligomérisation

L'implication directe de Bax dans la libération du cytochrome c est mise en évidence en 1997 grâce à un système d'expression hétérologue de Bax dans la levure (Manon *et al.*, 1997) puis en 1998 *in vitro* sur mitochondries isolées (Jürgensmeier *et al.*, 1998). Cependant le mécanisme de perméabilisation de la membrane mitochondriale externe demeurait inconnu. En 2000 une étude montre que la forme oligomérique de Bax, mais pas sa forme monomérique, déclenche la relocalisation du cytochrome c. Les oligomères de Bax sont formés par l'ajout d'un détergent, l'octyl glucoside, et ont une masse apparente d'environ 140 à 160 kDa (hexamère à octamère). Aussi bien la forme entière de Bax qu'un variant dépourvu de l'hélice  $\alpha 9$  peuvent former une structure oligomérique capable de relarguer le cytochrome c. Ceci indique que bien que l'hélice  $\alpha 9$  puisse être insérée dans la membrane, il ne semble pas qu'elle participe directement à la formation de l'oligomère (Antonsson *et al.*, 2000). Ces oligomères de Bax ont également été observés *in vivo*, seulement après induction de l'apoptose, et pourraient regrouper jusqu'à 12 unités de Bax (Antonsson *et al.*, 2001). Ces valeurs sont en accord avec la taille des oligomères supposés participer à la formation du canal formé par Bax dans la membrane mitochondriale externe qui est estimé à 9 unités (Martinez-Caballero *et al.*, 2009).

Les hélices  $\alpha 5$  et  $\alpha 6$  semblent directement impliquées dans la formation des oligomères. Les peptides correspondant à ces hélices peuvent former des pores *in vitro* dans des liposomes et permettre le passage de polymères de dextran d'une taille allant jusqu'à 70 kDa. L'efficacité de formation d'un pore est également dépendante de la composition lipidique des liposomes. La présence en petites quantités de lipides apportant aux membranes un degré de courbure positif (5-10% de lysophosphatidylcholine) et négatif (25% de phosphatidyléthanolamine) favorise la perméabilisation des liposomes induite par les hélices  $\alpha 5$  et  $\alpha 6$  (García-Sáez *et al.*, 2005).

L'étude topologique de Bax décrite précédemment (Annis *et al.*, 2005) est réalisée dans un modèle cellulaire particulier et apporte des indices quand à la chronologie des étapes d'insertion et d'oligomérisation de Bax. Les cellules utilisées sont dépourvues du gène c-myc et présentent la particularité d'être résistantes à l'apoptose induite par Bax. Dans ces cellules Bax est correctement adressée vers la mitochondrie et insérée dans la membrane mais la protéine reste à l'état monomérique, est incapable de former un pore et d'induire la perméabilisation de la membrane externe. Ce résultat est en faveur de l'hypothèse selon laquelle l'insertion de Bax précède son oligomérisation (Annis *et al.*, 2005).

Récemment le rôle du sillon hydrophobe de Bax (domaines BH1–3) a été décrit comme une interface complémentaire pouvant participer à son oligomérisation (Ding *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010).

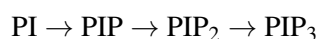
## 2 Rôle de la phosphorylation de Bax

### 2.1 La voie Akt/PKB

Akt1/PKB ou Akt1 est une kinase de survie identifiée sur la base de l'homologie avec la forme virale de la protéine et caractérisée comme possédant des propriétés oncogéniques dans des adénocarcinomes gastriques humains (Staal, 1987). Elle fait partie de la famille Akt comprenant également Akt2, une isoforme spécialisée dans la régulation du métabolisme du glucose, et Akt3 une isoforme principalement présente dans le cerveau et dont le rôle est à ce jour mal connu.

Des souris déficientes pour Akt1 présentent une taille anormalement petite due à un défaut de croissance ainsi qu'une susceptibilité accrue à l'apoptose. Les souris sont sensibles à l'apoptose induite par une irradiation  $\gamma$  ou la dexaméthazone, présentent une apoptose spontanée des cellules du thymus. Les mâles ont un défaut de spermatogenèse. Enfin des fibroblastes en culture sont beaucoup plus sensibles à toute une variété d'inducteurs de l'apoptose (Chen *et al.*, 2001b).

Au niveau moléculaire, Akt/PKB possède un domaine de liaison aux phospholipides (Pleckstrin homology domain) et plus particulièrement au PIP<sub>2</sub> (phosphatidylinositol-biphosphate) et au PIP<sub>3</sub> (phosphatidylinositol-triphosphate). Ces phospholipides dérivés du phosphatidylinositol sont présents dans la membrane plasmique. Le PIP<sub>3</sub> est produit selon le mécanisme suivant par des phosphatidylinositol-3-kinases (PI3K), des enzymes activées à la suite de la stimulation de récepteurs de survie (récepteur tyrosine kinase, récepteurs couplés aux protéines G). La voie de signalisation d'Akt est présentée en figure 19.



Différentes classes de PI3K existent et celles impliquées dans la signalisation des phénomènes de survie et d'apoptose sont les PI3K de classe I. La protéine phosphatase PTEN peut contrecarrer l'effet des PI3K en déphosphorylant les dérivés phosphorylés du phosphatidylinositol.

Les PIP<sub>2</sub> et PIP<sub>3</sub> permettent donc le recrutement d'Akt à la membrane plasmique où elle est prise en charge par les kinases mTORC2 et PDPK1 (ou PDK1) et phosphorylée respectivement sur la sérine 473 et la thréonine 308. Elle est ensuite relocalisée dans le cytosol.

Les substrats d'Akt sont très variés et la kinase influence de nombreuses voies de signalisations. La kinase active ainsi des protéines du cycle cellulaire (Chk1), de l'inflammation (IKK $\alpha$ ), des facteurs de survie (NF- $\kappa$ B, Mdm2 qui participe à l'inhibition de p53, ASK1) et inhibe des protéines de l'apoptose (les protéines proapoptotiques Bad et Bax, la caspase 9, la kinase GSK-3 $\beta$ ).

### 2.2 La kinase GSK-3 $\beta$

GSK-3 $\beta$  (glycogène synthase kinase  $\beta$ ) participe en conditions normales à la régulation du métabolisme du glycogène en phosphorylant et inhibant la glycogène synthase. Cette inhibition peut être levée par l'insuline *via* une signalisation par son récepteur induisant l'activation de la voie Akt/PKB (Cross *et al.*, 1995). Les kinases PKC (Goode *et al.*, 1992) et PKA (Fang *et al.*, 2000) sont également impliquées dans l'inhibition de GSK-3 $\beta$ . D'autres substrats tels que le NFAT (facteur de transcription des lymphocytes T activés) sont inhibés par GSK-3 $\beta$ .

Le site consensus de phosphorylation est particulier, il nécessite en effet qu'un résidu situé en n+4

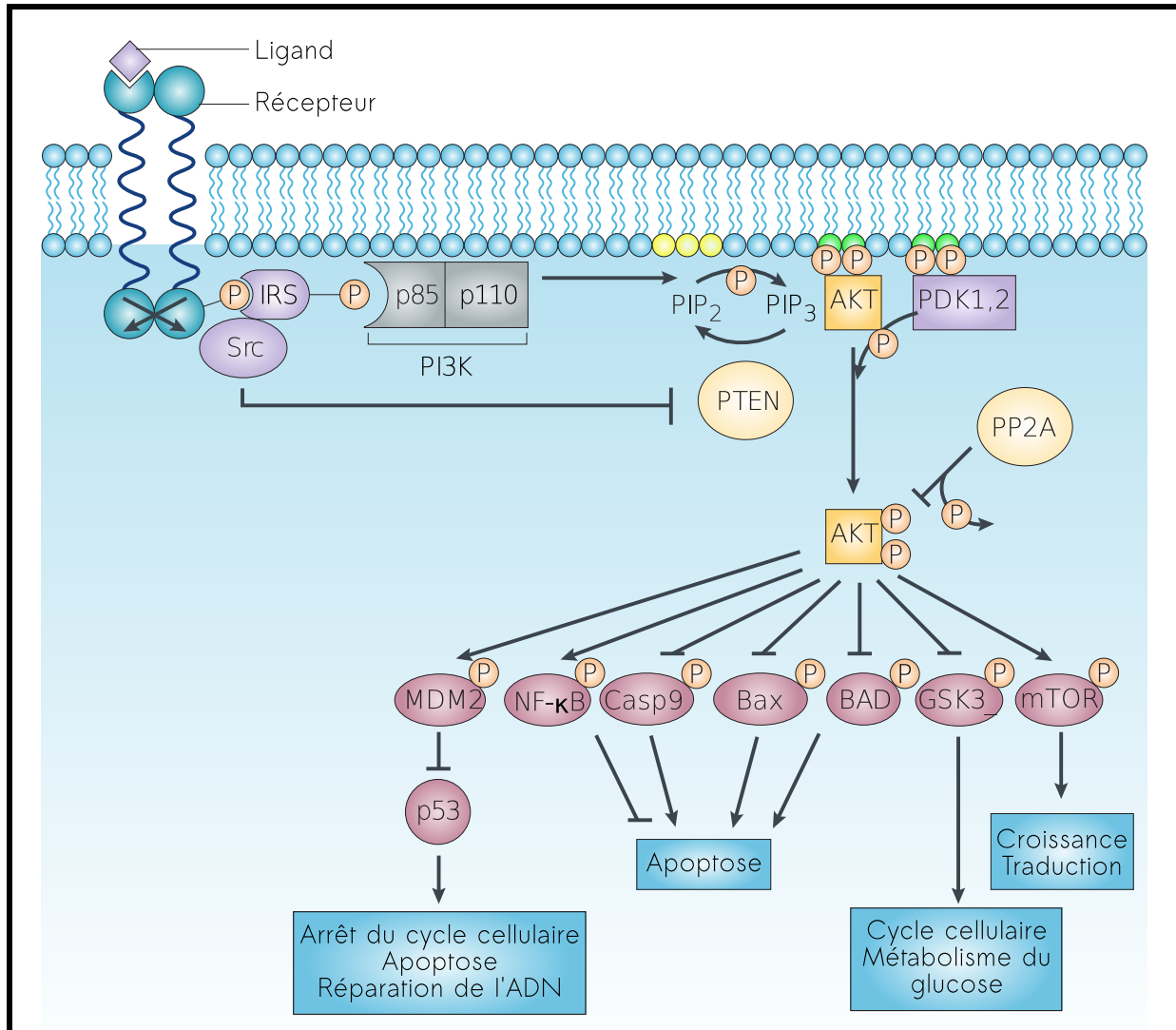
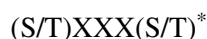


FIGURE 19 – Voies de signalisation PI3K/Akt

La fixation de son ligand (par exemple des facteurs de croissance) sur un récepteur (récepteurs tyrosine kinase) de la voie des phosphatidylinositols-3-kinases (PI3K) conduit à l'activation des PI3K de classe I et à l'inhibition de la phosphatase PTEN. Les PI3K de classe I peuvent catalyser la phosphorylation des phosphatidylinositols 4,5-disphosphate (PIP<sub>2</sub>) de la membrane plasmique en phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PIP<sub>3</sub>). Les PIP<sub>3</sub> peuvent recruter PDK1/2 et son substrat Akt et entraîner la phosphorylation d'Akt. Une fois phosphorylée Akt est relocalisée vers le cytosol où elle peut phosphoryler une grande variété de substrats. Akt active principalement des voies de survie cellulaire et réprime des voies de mort cellulaire. (d'après Vivanco et Sawyers, 2002)

de l'acide aminé cible soit déjà phosphorylé pour que le substrat puisse être reconnu par GSK-3 $\beta$  (Fiol *et al.*, 1987).



Au cours de l'apoptose l'inhibition exercée par Akt sur GSK-3 $\beta$  (par une phosphorylation sur la sérine 9) est levée et la kinase peut prendre en charge les substrats suivants. La protéine antiapoptotique Mcl-1 est phosphorylée sur la sérine 159 diminuant sa stabilité et conduisant à sa dégradation (Maurer *et al.*, 2006). La protéine Mdm2 est inactivée par une phosphorylation sur la sérine 254 ce qui favorise l'action de p53 (Kulikov *et al.*, 2005). La protéine phosphatase PTEN, antagoniste des PI3K, est activée par de multiples phosphorylations pour lesquelles GSK-3 $\beta$  est une des kinases impliquées (sérine 362, thréonine 366) (Al-Khouri *et al.*, 2005).

La localisation de GSK-3 $\beta$  a longtemps été considérée comme exclusivement cytosolique en raison de son implication dans le métabolisme du glycogène. En réalité la kinase peut également être nucléaire (Diehl *et al.*, 1998) et mitochondriale (Hoshi *et al.*, 1996). Alors que GSK-3 $\beta$  est principalement cytosolique dans des cellules de neuroblastomes, l'induction de l'apoptose entraîne une forte relocalisation vers le noyau (Bijur et Jope, 2003a).

## 2.3 Phosphorylation de Bax et contrôle de l'apoptose

Riche en sérines, thréonines et tyrosines, Bax est potentiellement phosphorylable sur de nombreux résidus. À ce jour trois sites de phosphorylation ont été effectivement caractérisés (sérines 163 et 184, thréonine 167), un quatrième site (sérine 60) est également un bon candidat (Figure 20).

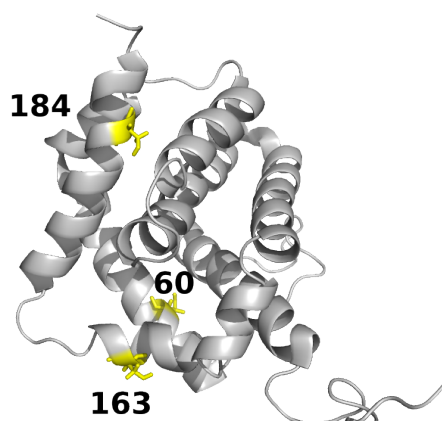


FIGURE 20 – Localisation des sérines phosphorylables de Bax

### 2.3.1 Sérine 60

La sérine 60 est située dans un site consensus de phosphorylation par la protéine kinase A (motif KKLS). À ce jour cette phosphorylation potentielle n'a pas été rapportée cependant l'étude de mutants phosphomimétiques chez *Saccharomyces cerevisiae* a permis de montrer un rôle éventuel de ce résidu. Alors que le mutant P168A exprimé dans la levure est fortement adressé vers la mitochondrie et entraîne

une relocalisation du cytochrome c vers le cytosol, le double mutant P168A S60A (mimant une sérine non phosphorylée) n'est que faiblement adressé et actif (Arokium *et al.*, 2007).

### 2.3.2 Sérine 163

Comme cela est décrit dans la partie précédente, GSK3- $\beta$  peut être contrôlée par la voie PI3K/Akt. Des cellules granulaires du cortex cérébelleux entrent en apoptose en absence de sérum dans leur milieu de culture. GSK3- $\beta$  phosphorylée par Akt est alors déphosphorylée et activée puis phosphoryle elle-même directement et spécifiquement la sérine 163 de Bax d'une construction GFP-Bax. Dans ces conditions ou en présence d'un variant constitutivement actif de GSK-3 $\beta$  (mutant S9A), la protéine de fusion GFP-Bax est adressée vers la mitochondrie. Le rôle du résidu thréonine 167 dans la reconnaissance de Bax par GSK-3 $\beta$  est testé grâce au mutant T167A. Le mutant est toujours phosphorylé par la kinase *in vitro* mais sa relocalisation vers la mitochondrie est fortement diminuée (Linseman *et al.*, 2004).

Le mutant phosphomimétique S163D exprimé chez *Saccharomyces cerevisiae* n'a pas un comportement sensiblement différent de celui de la protéine native. En revanche cette mutation est capable de restaurer l'adressage du double mutant P168A S60A. Une hypothèse pouvant expliquer cette observation est que le double mutant soit plus propice à un changement de conformation de par la plus grande mobilité de son hélice  $\alpha 9$ . Cette approche suggère que le rôle de la phosphorylation de la sérine 163 consisterait en une régulation des changements de conformation de Bax plus qu'en une activation directe (Arokium *et al.*, 2007).

### 2.3.3 Thréonine 167

Sous l'action de divers inducteurs de l'apoptose, les kinases p38 et JNK, de la voie des MAP kinases, peuvent être activées. Dans un tel modèle d'étude, GFP-Bax est phosphorylée, relocalisée vers la mitochondrie et entraîne une perméabilisation de la membrane externe associée au déclenchement de l'apoptose par le cytochrome c. Cette phosphorylation de GFP-Bax est absente en présence d'inhibiteurs de p38 ou de JNK. Bien que les auteurs ne montrent pas la capacité *in vitro* pour p38 et JNK de phosphoryler Bax plusieurs indices suggèrent une implication directe d'une phosphorylation sur le résidu 167. Tout d'abord Bax possède deux motifs caractéristiques de ces kinases (une sérine ou une thréonine suivie d'une proline) en position 87 et 167. Enfin une mutation T167D, mais pas S87D, empêche la phosphorylation de Bax dans ces conditions (Kim *et al.*, 2006a). Si Bax est effectivement phosphorylée sur la thréonine 167, il reste à déterminer si cette phosphorylation est suffisante à l'activation de Bax ou s'il s'agit d'une étape intermédiaire favorisant par exemple la phosphorylation de la sérine 163.

### 2.3.4 Sérine 184

Le rôle de la sérine 184 dans la régulation de l'activation de Bax a été suggéré en 1999 par l'équipe de Richard Youle (Nechushtan *et al.*, 1999). En utilisant différents mutants de la sérine 184 de l'hélice  $\alpha 9$  d'une construction GFP-Bax, ils montrent que ce résidu est critique dans la modulation de l'adressage de la protéine de fusion. Alors que GFP-Bax n'est relocalisée vers la mitochondrie que lors de l'induction de l'apoptose, les mutants S184V, S184A ou la suppression de la sérine induisent une localisation mito-

chondriale constitutive de la protéine de fusion. À l'inverse les mutants S184D, S184E et S184K ne sont pas relocalisés, même lors de l'induction de l'apoptose ou surexprimés d'un facteur 5. Une hypothèse expliquant leurs observations est qu'à l'état mimant l'absence d'une phosphorylation (Bax sauvage et les mutants valine et alanine) le résidu puisse favoriser une stabilisation de la conformation fermée de Bax en maintenant l'hélice  $\alpha 9$  dans le sillon hydrophobe.

Par ailleurs cette étude montre qu'en l'absence de stimuli apoptotiques les mutants constitutivement adressés à la mitochondrie ne présentent pas de libération de leur extrémité N-terminale (pas de reconnaissance par l'anticorps conformationnel 6A7) indiquant que l'étape d'adressage ne semble pas suffisante à rendre Bax active. Enfin la coexpression des protéines antiapoptotiques Bcl-2 ou Bcl-x<sub>L</sub> empêche la perméabilisation induite par Bax mais sans altérer la relocalisation des mutants constitutivement adressés à la mitochondrie.

Plusieurs équipes ont par la suite mis en évidence une phosphorylation de la sérine 184 de Bax. La première suggestion de l'implication de la protéine kinase Akt dans la phosphorylation de Bax date d'une étude de 2001 montrant une corrélation entre l'activation d'Akt et la perte de la fonction proapoptotique d'une construction GFP-Bax. Une construction GFP-Bax dépourvue de la sérine 184 n'est plus affectée par la présence d'Akt (Yamaguchi et Wang, 2001). En 2004 il est montré dans des neutrophiles que Bax peut être phosphorylée sur ce résidu par Akt après traitement avec une cytokine antiapoptotique (GM-CSF). La phosphorylation empêche l'apoptose en abolissant l'adressage de Bax vers la mitochondrie. Il est montré en parallèle que dans ces conditions l'interaction de Bax avec les protéines Bcl-x<sub>L</sub> et Mcl-1 est renforcée et dépend de la sérine 184 sans toutefois qu'un lien de cause à effet avec la perte de localisation mitochondriale de Bax soit démontré (Gardai *et al.*, 2004). L'année suivante cette observation est confirmée dans un modèle utilisant la nicotine comme agent antiapoptotique. La nicotine induit l'activation d'Akt *via* la voie des PI3K et la phosphorylation directe de Bax sur la sérine 184. La translocation de Bax vers la mitochondrie et son insertion dans la membrane externe sont alors abrogées, même en présence d'un stimulus apoptotique. Des mutants phosphomimétiques ont un comportement similaire. La demi-vie de Bax est également réduite en présence de nicotine (Xin et Deng, 2005). Une troisième équipe montre que, lors de l'apoptose induite par un stress oxydatif, l'activation de Bax, dépendante des kinases p38 et JNK, peut être réprimée par la présence d'interleukine 6 (IL-6) ou d'un inhibiteur de p38/JNK. La présence d'IL-6 provoque l'activation d'Akt et l'inhibition de la fonction proapoptotique de Bax par une phosphorylation sur la sérine 184 (Kolliputi et Waxman, 2009).

Une autre kinase, PKC $\zeta$ , a également été mise en évidence comme étant impliquée dans la phosphorylation de la sérine 184 dans le modèle utilisant la nicotine comme agent antiapoptotique décrit précédemment. D'une façon cohérente avec les résultats connus, la phosphorylation empêche l'adressage vers la mitochondrie, l'insertion et l'activation de Bax. Cependant, alors que Gardai *et al.* proposent un rôle important des protéines antiapoptotiques de la famille Bcl-2 dans la rétention cytosolique de la forme phosphorylée sur la sérine 184 de Bax, les mécanismes proposés dans cet article sont différents. Les auteurs observent en effet une interaction détectable par immunoprécipitation entre Bax et PKC $\zeta$  (mais pas avec le mutant inactif K281W de PKC $\zeta$  incapable de fixer l'ATP). Cette interaction semble dépendante du domaine BH3 de Bax et est capable de déplacer une interaction entre Bax et Bcl-2 (Xin *et al.*, 2007).

Une étude de la même équipe montre que la phosphorylation de Bax est également régulée par la phosphatase PP2A. PP2A, activée par les céramides, induit une perte de la phosphorylation inhibitrice de Bax induite par Akt en présence de nicotine. Bax est alors adressée vers la mitochondrie, peut s'oligomériser dans la membrane mitochondriale et entraîner la relocalisation du cytochrome c dans le cytosol. Dans cette étude Bax et Bcl-2 interagissent lorsque Bax est phosphorylée et cette interaction diminue lors de l'activation de PP2A et de la déphosphorylation de Bax (Xin et Deng, 2006).

# Objet de l'étude et stratégie mise en œuvre

Le rôle particulier des membres proapoptotiques à multidomaines de la famille Bcl-2 en fait des acteurs clés de la voie intrinsèque de l'apoptose. À ce jour Bax est le membre le plus étudié des protéines proapoptotiques à multidomaines et son mécanisme général d'action est bien caractérisé. Bax est cytosolique au cours de la vie des cellules. Lorsque la voie intrinsèque de l'apoptose est initiée, Bax est adressée vers la mitochondrie, elle s'insère dans la membrane externe, s'oligomérisé et participe à la perméabilisation de la membrane nécessaire à la libération de facteurs apoptogéniques mitochondriaux. Un grand nombre de questions subsiste toutefois concernant le détail moléculaire de ces mécanismes.

La structure de la forme cytosolique de Bax aura été déterminée par RMN il y a 10 ans à l'heure de l'écriture de ces lignes. La connaissance de l'organisation de la forme soluble de Bax a permis la compréhension de nombreux mécanismes et a notamment permis de déterminer ou confirmer l'implication des différents domaines de Bax lors des différentes étapes de la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe. Les nombreux travaux ayant étudié ces mécanismes ont mis en évidence que Bax doit être activée pour provoquer la perméabilisation de la membrane mitochondriale. Cette activation nécessite indubitablement un ou plusieurs changements de conformation. La nature des changements de conformation de Bax et la chronologie des différentes étapes de l'activation de Bax sont des points encore largement débattus et auxquels nous avons contribué par ce travail. La partie fondamentale de ce travail de recherche s'articule autour de deux aspects de la régulation des étapes d'activation de Bax.

La première partie apporte des éléments sur la régulation de l'activation de Bax par phosphorylation. Nous avons tout d'abord étudié l'implication de mutations mimant la présence ou l'absence d'une phosphorylation sur les différentes étapes de l'activation de Bax. Nous nous sommes par la suite intéressés au rôle direct des kinases Akt et GSK-3 $\beta$  (toutes deux identifiées comme des partenaires de Bax) sur ces mêmes étapes afin de caractériser les mécanismes moléculaires mis en jeu.

La seconde partie est focalisée sur le rôle de la protéine antiapoptotique Bcl-x<sub>L</sub>. Bcl-x<sub>L</sub> est un membre de la famille Bcl-2 structuralement très proche de Bax mais qui réprime le déroulement de la perméabilisation de la membrane mitochondriale en empêchant l'activation de Bax. Il est établi que l'effet inhibiteur de Bcl-x<sub>L</sub> sur Bax passe par une interaction directe entre les deux protéines ; toutefois les mécanismes exacts mis en œuvre et notamment les étapes de l'activation de Bax inhibés par Bcl-x<sub>L</sub> restent à être caractérisés.

Enfin une troisième partie apportera des éléments de réflexion sur la possibilité de mettre au point un système rapporteur de l'activation de Bax utilisable pour réaliser des cribles de molécules ou de mutants pouvant moduler l'activation de Bax.

L'étude des mécanismes d'activation de Bax et de leurs régulations dans un contexte cellulaire com-

portant tous les acteurs de l'apoptose peut présenter l'inconvénient d'une trop grande complexité dans les interactions possibles et le risque de passer à côté de certaines des étapes moléculaires mis en jeu. Nous avons principalement réalisé cette étude en utilisant la levure *Saccharomyces cerevisiae* comme outil afin de caractériser les différentes étapes de l'activation de Bax. La levure ne possède aucun homologue des protéines de la famille Bcl-2 ni aucun des principaux acteurs de l'apoptose et constitue par conséquent un fond « propre » pour l'expression de Bax. Lorsque Bax  $\alpha$  est exprimée non étiquetée chez *Saccharomyces cerevisiae*, elle est cytosolique et inactive. Des variants actifs peuvent être obtenus par mutation de certains résidus (Arokium *et al.*, 2004, 2007), par l'ajout d'une étiquette telle que l'étiquette c-myc (Priault *et al.*, 2003) ou encore par la coexpression de protéines activatrices telles que tBid (Gonzalez *et al.*, 2005) ou PUMA (Gallenne *et al.*, 2009). Une forme active de Bax peut être relocalisée vers la mitochondrie, s'insérer dans la membrane externe, former des oligomères et entraîner la libération du cytochrome c. Bien que correspondant à des événements non physiologiques pour la levure, ces différentes étapes d'activation de Bax sont parfaitement en adéquation avec celles observées dans des cellules animales. La coexpression de protéines antiapoptotiques de la famille Bcl-2 (Bcl-2 ou Bcl-x<sub>L</sub>) permet de réprimer l'activation de Bax et la libération du cytochrome c (Priault *et al.*, 1999; Arokium *et al.*, 2004). L'interaction de Bax avec certains partenaires, tels le récepteur Tom22, est conservée dans la levure (Bellot *et al.*, 2007).

La levure représente ainsi un bon système pour l'étude de l'interaction de Bax avec la mitochondrie. C'est également un organisme très bien caractérisé, facile à manipuler génétiquement et à cultiver, et permettant d'obtenir de grandes quantités de matériel biologique, ce qui en fait un outil adéquat pour les études biochimiques des relations structure/fonction ainsi que, potentiellement, pour des criblages moléculaires.

## **Deuxième partie**

### **Résultats**



# Caractérisation du rôle des kinases Akt et GSK-3 $\beta$ sur le processus d'activation de Bax

## Sommaire

|     |                                                                                                                    |     |
|-----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1   | Introduction . . . . .                                                                                             | 79  |
| 2   | Données préliminaires . . . . .                                                                                    | 81  |
| 2.1 | Expression des protéines dans la levure . . . . .                                                                  | 81  |
| 2.2 | Mutants phosphomimétiques . . . . .                                                                                | 81  |
| 2.3 | Rôle du résidu 184 dans l'adressage de Bax, une première approche des changements de conformation de Bax . . . . . | 83  |
| 2.4 | Discussion . . . . .                                                                                               | 86  |
| 3   | Étude du rôle de la protéine kinase Akt . . . . .                                                                  | 89  |
| 3.1 | Clonage d'AKT1 . . . . .                                                                                           | 89  |
| 3.2 | Expression d'Akt chez la levure . . . . .                                                                          | 90  |
| 3.3 | Adressage vers la mitochondrie et insertion membranaire . . . . .                                                  | 90  |
| 3.4 | Activation de Bax et perméabilisation de la membrane mitochondriale . . . . .                                      | 92  |
| 3.5 | Localisation d'Akt . . . . .                                                                                       | 93  |
| 3.6 | Discussion . . . . .                                                                                               | 95  |
| 4   | Étude du rôle de la protéine kinase GSK-3 $\beta$ . . . . .                                                        | 97  |
| 4.1 | Clonage et expression de GSK-3 $\beta$ chez la levure . . . . .                                                    | 97  |
| 4.2 | Effet de GSK-3 $\beta$ sur le caractère mitochondrial de Bax . . . . .                                             | 97  |
| 4.3 | Activation de Bax et perméabilisation . . . . .                                                                    | 100 |
| 4.4 | Localisation de GSK-3 $\beta$ . . . . .                                                                            | 102 |
| 4.5 | Discussion . . . . .                                                                                               | 104 |
| 5   | Caractérisation de la phosphorylation de Bax . . . . .                                                             | 106 |
| 6   | Discussion . . . . .                                                                                               | 106 |

## 1 Introduction

La fonction mitochondriale Bax fait intervenir des domaines spécifiques de la protéine. Il a été mis en évidence une implication des extrémités de Bax (boucle N-terminale, hélices  $\alpha 1$  et  $\alpha 9$ ) dans la régulation

de son adressage vers la mitochondrie. Les hélices  $\alpha 5$  et  $\alpha 6$ , enfouies au cœur de la protéine dans sa conformation soluble, participent à l'insertion de Bax dans la membrane mitochondriale externe. De même les domaines d'homologie BH1, BH2 et BH3 définissant la famille et permettant l'interaction entre ses différents membres ne sont pas accessibles dans la conformation native de Bax. Ces domaines forment une poche hydrophobe dans laquelle repose l'hélice  $\alpha 9$  empêchant son accessibilité à d'autres protéines.

Afin de pouvoir être relocalisée vers la mitochondrie, s'insérer dans la membrane externe et entraîner sa perméabilisation, Bax doit changer de conformation et exposer les principaux domaines décrits précédemment. Divers facteurs participent au changement de conformation associé à l'activation de Bax, parmi lesquels l'interaction avec les membres proapoptotiques à BH3-seulement activateurs (tBid ou Bim par exemple).

Il a été mis en évidence une implication des kinases Akt et GSK-3 $\beta$  dans le contrôle de l'apoptose. Ces kinases entraînent respectivement une inhibition et une activation de l'apoptose. Il a été démontré qu'Akt et GSK-3 $\beta$  peuvent phosphoryler Bax directement et influencer son comportement. Akt est une kinase généralement impliquée dans des voies de survie cellulaire. Elle est activée par phosphorylation *via* la voie des PI3 kinases lorsqu'elle est recrutée au niveau des phosphatidylinositols triphosphates de la membrane plasmique. Elle est notamment impliquée dans la régulation de l'apoptose en phosphorylant et activant des facteurs antiapoptotiques (NF- $\kappa$ B) et en inhibant des facteurs proapoptotiques (Bad, caspase 9, Bax. . .). Elle phosphoryle Bax sur la sérine 184 et inhibe sa translocation vers la mitochondrie et la libération du cytochrome c. La demi-vie de Bax est par ailleurs réduite lorsqu'elle est phosphorylée sur ce résidu. En parallèle lors de l'activation d'Akt, une interaction accrue de Bax avec les protéines antiapoptotiques Bcl-x<sub>L</sub> et Mcl-1 a été observée. (Gardai *et al.*, 2004; Xin et Deng, 2005). À l'inverse la déphosphorylation de Bax sur la sérine 184 par la protéine phosphatase PP2A déclenche l'apoptose en libérant Bax de l'interaction avec Bcl-2 (Xin et Deng, 2006). GSK-3 $\beta$ , fréquemment impliquée dans la médiation de l'apoptose neuronale, peut phosphoryler Bax sur la sérine 163 lorsque les cellules sont cultivées en absence de facteurs de croissance. Elle promeut l'adressage de Bax vers la mitochondrie et l'exposition de la partie N-terminale et favorise ainsi l'exécution de l'apoptose. (Linseman *et al.*, 2004)

Dans cette première partie nous avons cherché à comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de Bax par les kinases Akt et GSK-3 $\beta$ . Nous avons notamment étudié le rôle de ces kinases lors des différentes étapes de l'activation de Bax et tenté de caractériser leur influence sur les changements de conformation de Bax.

Les étapes auxquelles nous nous sommes intéressés sont les étapes d'adressage de Bax vers la mitochondrie, son insertion dans la membrane externe et enfin la libération du cytochrome c. Notre approche permet, en exprimant les protéines humaines chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, de faire abstraction du fond complexe de signalisation de l'apoptose présent dans les cellules animales et d'isoler ces étapes afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués.

## 2 Données préliminaires

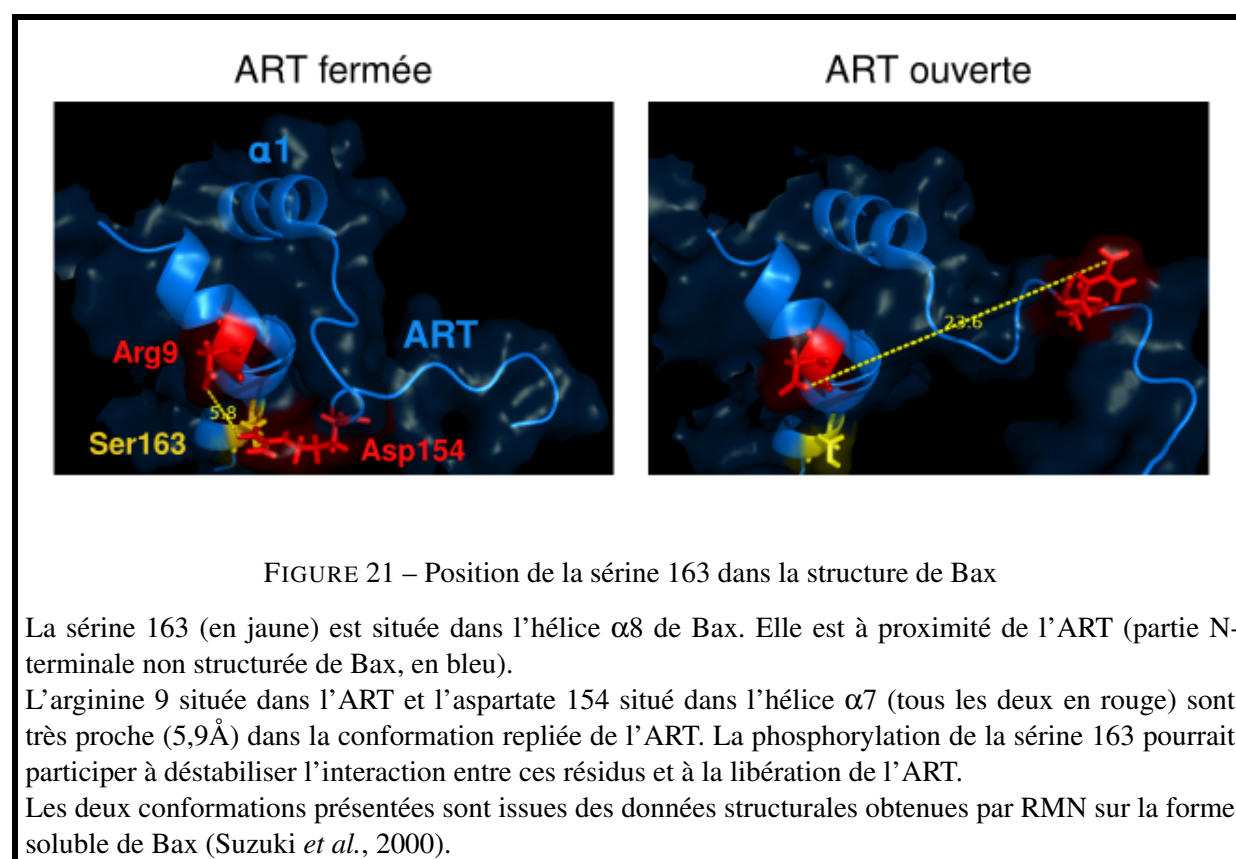
### 2.1 Expression des protéines dans la levure

Afin d'exprimer Bax et ses partenaires chez *Saccharomyces cerevisiae*, plusieurs plasmides ont été utilisés. L'ADNc codant pour la protéine Bax  $\alpha$  humaine a été placé dans un plasmide multicopie pYes3 sous le contrôle d'un promoteur fort inductible par le galactose (GAL1). Les codons ont été adaptés au biais d'utilisation de la levure (Greenhalf *et al.*, 1996). Cette stratégie permet à la fois de contrôler la durée pendant laquelle est exprimée Bax et d'assurer une quantité suffisante de protéine pour en étudier les effets sur la mitochondrie.

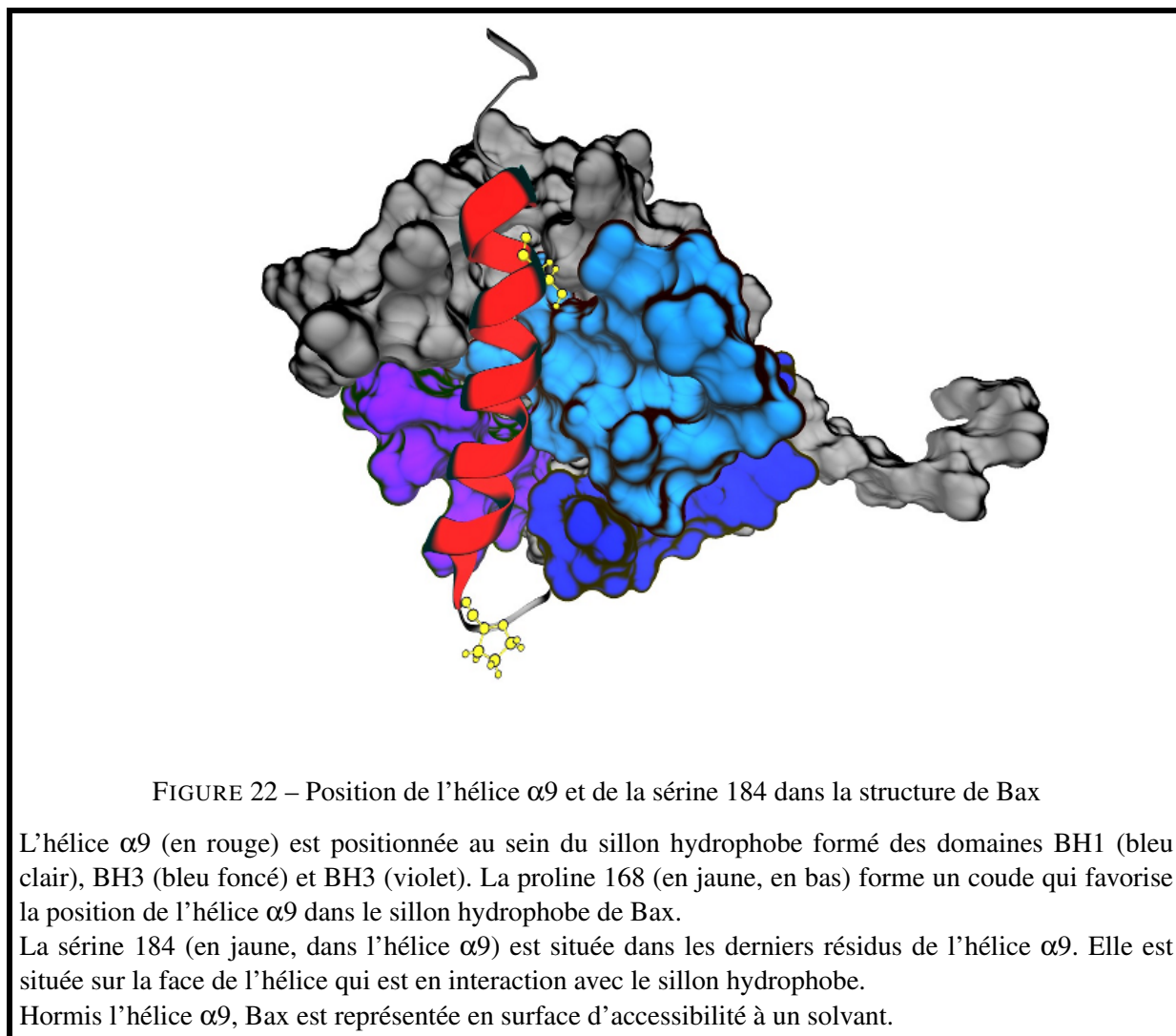
Les ADNc codant pour les kinases humaines GSK-3 $\beta$  et Akt ont été placés respectivement sous le contrôle des promoteurs ADH1 (alcool déshydrogénase) et Tet-off. Le premier permet une expression constitutive de GSK-3 $\beta$  et le second est réprimable par l'ajout de doxycycline. Il est ainsi possible de dissocier l'expression des différentes protéines.

### 2.2 Mutants phosphomimétiques

La première approche de ce travail a été réalisée dans la continuité des travaux précédemment accomplis dans l'équipe. Bax possède plusieurs résidus potentiellement phosphorylables, notamment les sérines 163 et 184. Le résidu 163 est localisé au sein de l'hélice  $\alpha 8$  et est, dans la structure tertiaire de la protéine, à proximité de l'ART et de l'hélice  $\alpha 1$  (Figure 21).



La sérine 184 est située vers la fin de l'hélice  $\alpha 9$  et fait face au sillon hydrophobe formé des domaines BH1-3, dans lequel est positionnée l'hélice (Figure 22).



La substitution de résidus phosphorylables par un aspartate ou une alanine permet de mimer respectivement la présence ou l'absence d'une phosphorylation (Léger *et al.*, 1997). L'avantage de ce système est que la modification post-traductionnelle qui est simulée est constitutive et ne dépend pas du niveau d'expression ou d'activité d'une kinase. Le principal inconvénient est qu'il ne s'agit que d'une imitation d'un groupement phosphate. En effet l'aspartate a une taille et une charge inférieures à celles d'une sérine phosphorylée, ce fait pouvant notamment changer l'étendue de l'effet de la modification. Ainsi, bien que cette approche soit couramment utilisée il est possible que les conséquences biochimiques découlant d'une telle substitution puissent ne pas refléter les effets d'une réelle phosphorylation.

Cette approche représente ainsi un point de départ important et relativement facile à réaliser expérimentalement mais elle doit être complétée par l'étude du comportement de la protéine en présence des kinases connues pour phosphoryler la protéine.

## 2.3 Rôle du résidu 184 dans l'adressage de Bax, une première approche des changements de conformation de Bax

L'équipe de Richard Youle démontre en 1999 l'importance de la sérine 184. Une construction GFP-Bax dépourvue du résidu 184 ou dont la sérine a été mutée en alanine ou en valine est constitutivement localisée à la mitochondrie. En dépit de cette localisation mitochondriale l'exposition de la partie N-terminale de Bax (rapportée par l'anticorps conformationnel 6A7) n'a pas lieu. À l'inverse, des constructions GFP-Bax pour lesquelles la sérine est substituée en lysine, aspartate ou glutamate ne sont pas relocalisées vers la mitochondrie, même lors de l'induction de l'apoptose par un traitement à la staurosporine (Nechushtan *et al.*, 1999). Ces résultats ont été obtenus en utilisant une construction de fusion entre la GFP et Bax. Or les extrémités de Bax sont fortement impliquées dans son adressage vers la mitochondrie et son activation. La présence d'étiquettes ou de protéines fusionnées est donc susceptible de modifier les mécanismes d'activation de Bax. Par ailleurs les données présentées précédemment ont été obtenues par microscopie de fluorescence et ne renseignent pas sur les mécanismes moléculaires d'activation de Bax. Nous avons donc cherché à tester ces conclusions en utilisant une approche biochimique basée sur la protéine non-étiquetée afin, d'une part, de nous affranchir des éventuels effets d'une construction chimérique de Bax et d'autre part de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation de Bax. Pour cela nous avons exprimé Bax ou différents mutants dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*. La levure ne possédant pas d'homologues des protéines de la famille Bcl-2 et des principaux acteurs de l'apoptose, nous avons pu individualiser les différentes étapes du processus d'activation de Bax en exprimant uniquement les protéines dont nous voulions étudier l'effet sur Bax.

La protéine Bax humaine native est cytosolique et inactive lorsqu'elle est exprimée chez *Saccharomyces cerevisiae*. Ces premiers résultats ont consisté à préciser les données obtenues sur le rôle de la sérine 184 de Bax (Arokium *et al.*, 2007). Cette sérine a été substituée par une alanine (mutant S184A mimant l'absence de phosphorylation) ou par un aspartate (mutant S184D mimant une phosphorylation).

### 2.3.1 Adressage vers la mitochondrie

La protéine Bax native ou les protéines mutantes S184A et S184D ont été exprimées dans la levure et leur propension à être spontanément adressées vers la mitochondrie a été déterminée qualitativement par western-blot sur mitochondries isolées (Figure 23).

Alors que la protéine native (qui tient le rôle de contrôle négatif) n'est quasiment pas relocalisée vers la mitochondrie, une proportion importante du mutant mimant l'absence de phosphorylation (S184A) est mitochondriale. Le mutant de Bax P168A est utilisé en témoin positif. La mutation de la proline 168 en alanine entraîne une forte mobilité de l'hélice  $\alpha 9$  responsable à la fois d'un fort adressage de la protéine vers la mitochondrie et de son activation entraînant une libération quasi-totale du cytochrome c.

Le mutant mimant la phosphorylation (S184D) est légèrement plus adressé que la protéine native mais est moins présent dans la fraction mitochondriale que le mutant S184A.

La modification de ce seul résidu est donc capable, en l'absence de tout partenaire de la famille Bcl-2, de modifier le comportement de Bax. La mutation en alanine pourrait entraîner l'adressage de la protéine en favorisant la mobilité de l'hélice  $\alpha 9$  et la libération de l'ART. Nous avons réalisé des essais

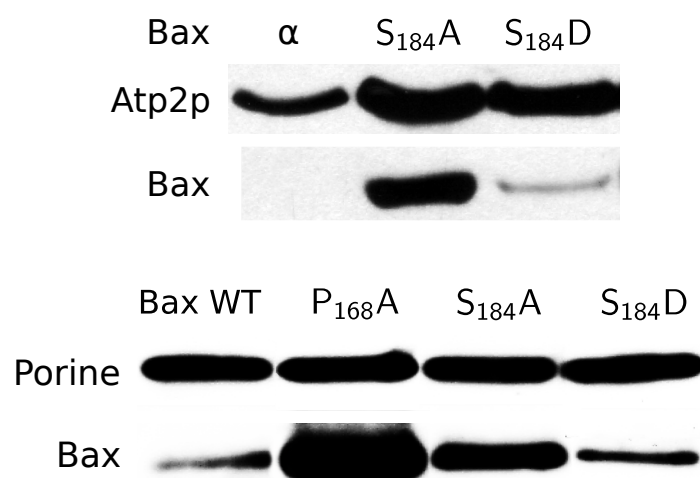


FIGURE 23 – Adressage mitochondrial des mutants de la sérine 184 de Bax

Des extraits protéiques d'une fraction mitochondriale (80  $\mu$ g) ont été analysés par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS suivie d'un transfert sur membrane et d'une immunodétection de Bax par l'anticorps polyclonal anti-Bax N20 ou de la sous-unité  $\beta$  de l'ATP synthase (Atp2p) ou de la porine (Por1p) comme marqueurs du compartiment mitochondrial. La protéine Bax native (Bax  $\alpha$ ) est peu adressée vers la mitochondrie. Le mutant S184D mimant la phosphorylation de la sérine 184 est légèrement plus adressé que Bax native. Le mutant S184A est fortement mitochondrial. Le mutant P168A est un témoin positif d'adressage vers la mitochondrie. Deux résultats indépendants sont présentés afin de montrer la variabilité de l'expérience.

d'immunoprécipitation de Bax avec l'anticorps conformationnel anti-Bax 6A7 afin de déterminer si la protéine exposait son extrémité N-terminale : aucune différence significative n'a pu être mise en évidence (résultat non montré).

### 2.3.2 Capacité à perméabiliser la membrane externe

La détermination de la capacité de Bax à induire la perméabilisation est un élément important, une forme mitochondriale de la protéine n'étant en effet pas nécessairement active (capable d'induire la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe). Le fait que Bax puisse être adressée vers la mitochondrie sans être activée et sans libération du cytochrome c a déjà été décrit, par exemple dans un modèle d'étude du détachement de la matrice extracellulaire de cellules épithéliales (Gilmore *et al.*, 2000) où la présence de la kinase p38MAPK semble contrôler l'activation de Bax une fois celle-ci adressée vers la mitochondrie (Owens *et al.*, 2009). Enfin la présence d'une forme inactive de Bax a été mise en évidence dans un modèle accumulant du cholestérol dans la membrane mitochondriale (Lucken-Ardjomande *et al.*, 2008).

La quantification des cytochromes d'une fraction enrichie en mitochondries permet de déterminer la capacité de Bax à former un canal dans la membrane mitochondriale externe et à entraîner la relocalisation du cytochrome c vers le cytosol.

Les cytochromes sont des hémoprotéines coordonnées à un ion métallique (généralement le fer). La

présence d'un atome métallique et la forte conjugaison (électrons  $\pi$ ) du groupement aromatique porphyrine de l'hème sont responsables des propriétés spectroscopiques des cytochromes traduites par une forte absorbance de leurs formes réduites à certaines longueurs d'ondes. Selon les cytochromes et notamment en fonction du type d'hème qui leur est associé, et selon l'état d'oxydation du noyau métallique de l'hème, la longueur d'onde d'absorbance maximale et le coefficient d'extinction molaire varient. En pratique, les formes oxydées des cytochromes absorbent la lumière aux mêmes longueurs d'onde que les formes réduites mais avec des coefficients d'extinction molaire plus faibles. On réalise donc des spectres différentiels d'absorbance entre les formes réduites et oxydées.

La mitochondrie possède plusieurs cytochromes. Le cytochrome c est situé dans l'espace intermembranaire bien qu'en interaction avec la membrane interne. Les cytochromes b et c1 font partie du complexe III (coenzyme Q-cytochrome c réductase). Les cytochromes a et a3 font partie du complexe IV (cytochrome c oxydase). Ces deux complexes sont situés dans la membrane interne. La présence dans la membrane et la très grande taille de ces complexes ( $\sim 500$  kDa à plus de 1000 kDa lorsqu'ils sont organisés en supercomplexes) fait que les cytochromes b, c1, a et a3 ne sont pas libérés lors de la perméabilisation induite par Bax. Les cytochromes c et c1 absorbent à une longueur d'onde de 550 nm, le cytochrome b à 561 nm et les cytochromes a et a3 à 603 nm. Il est possible de discriminer les pics d'absorbance des cytochromes c et c1 à très basse température ; le fait que le cytochrome c1 ne soit pas libéré et les contraintes techniques engendrées font que nous n'avons pas réalisé la quantification dans ces conditions.

En utilisant le cytochrome b comme standard interne et en se basant sur la stœchiométrie de 1 entre les cytochromes b et c1, il est possible de quantifier le cytochrome c résiduel après expression de Bax. La capacité de perméabilisation de Bax est d'autant plus importante que la quantité résiduelle de cytochrome c dans la fraction mitochondriale est faible. Comme le cytochrome c est le seul cytochrome libéré par la présence d'une forme active de Bax, le rapport entre les cytochrome c+c1 (pic d'absorbance à 550 nm) et le cytochrome b (pic à 561 nm) est voisin de 2 pour une souche de levure cultivée en conditions respiratoires, possédant des mitochondries fonctionnelles et n'exprimant pas Bax. À l'autre extrême, l'expression d'une forme active de Bax ayant pour conséquence une libération quasi-totale du cytochrome c fait chuter ce rapport à 1 (l'absorbance à 550 nm n'est alors due qu'au seul cytochrome c1). Les données présentées par la suite sont représentées en pourcentage de cytochrome c restant dans la fraction mitochondriale après expression de Bax.

Des mitochondries ont été purifiées à partir de souches exprimant soit la forme native de Bax soit les mutants de la sérine 184 et les cytochromes ont été quantifiés (Figure 24). La forme native de Bax, quasiment exclusivement cytosolique, n'entraîne aucune libération significative du cytochrome c. Le mutant S184A, qui mime une forme non phosphorylée de la sérine 184 et est fortement mitochondrial, entraîne une libération du cytochrome c. Cette libération est cependant limitée et environ 50% du cytochrome c reste mitochondrial.

Le mutant S184D, qui mime la présence d'une phosphorylation sur le résidu 184, induit en revanche une libération quasi-totale du cytochrome c en dépit de la faible quantité de Bax présente dans la fraction mitochondriale.

Lorsque la perméabilisation induite par les mutants S184A et S184D est rapportée à la quantité de

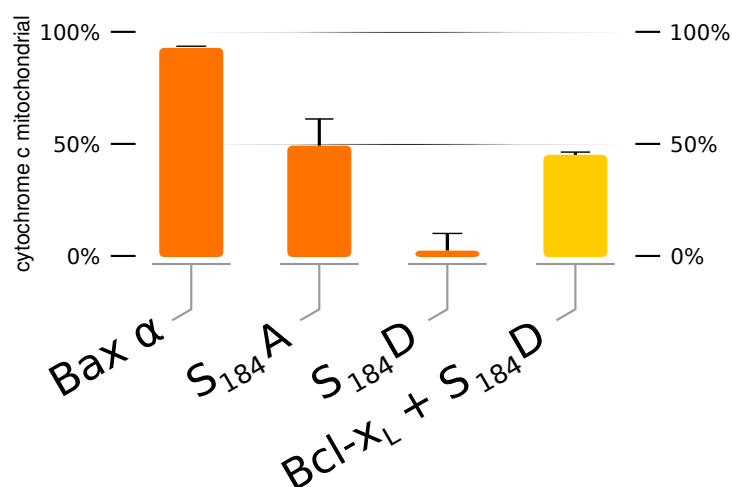


FIGURE 24 – Capacité des mutants de la sérine 184 à entraîner la libération du cytochrome c

La proportion de cytochrome c résiduelle après expression de différents variants de Bax a été mesurée par spectrophotométrie sur mitochondries isolées. La forme native de Bax (Bax  $\alpha$ ), peu mitochondriale, n'entraîne aucune libération de cytochrome c. Le mutant S184A, fortement mitochondrial, induit une libération d'environ 50% du cytochrome c. Le mutant S184D entraîne une libération quasi totale du cytochrome c qui peut être inhibée partiellement par une coexpression de la protéine antiapoptotique Bcl-x<sub>L</sub>.

Les mesures ont été effectuées sur au moins trois expériences indépendantes. Les barres d'erreur indiquent l'écart-type des mesures.

Bax adressée vers la mitochondrie, un profil très différent apparaît. Alors qu'une faible quantité du mutant S184D est suffisante pour la libération massive de cytochrome c, une quantité importante du mutant S184A n'induit qu'une libération limitée. Cette mesure traduit la capacité intrinsèque des mutants de Bax à entraîner la libération du cytochrome c. Le mutant S184D possède une capacité de perméabilisation très forte bien qu'il soit peu mitochondrial. À l'inverse, le mutant S184A est fortement mitochondrial mais peu efficace pour provoquer la libération du cytochrome c.

La coexpression de la protéine antiapoptotique Bcl-x<sub>L</sub> permet de contrecarrer l'effet du mutant S184D et diminue la perméabilisation induite par Bax. Cette observation, réalisée ici comme contrôle, permet de montrer que la libération du cytochrome c est spécifiquement due à Bax et qu'elle peut être régulée par ses partenaires physiologiques en accord avec les données expérimentales connues. Ce point sera discuté en détail dans la partie traitant de la protéine antiapoptotique Bcl-x<sub>L</sub>.

## 2.4 Discussion

Ces premiers résultats indiquent qu'il existe vraisemblablement deux étapes majeures et dissociables dans le processus de perméabilisation de la mitochondrie induit par Bax. Tout d'abord Bax doit être adressée vers la mitochondrie. Ce fait est très largement admis au sein de la communauté scientifique et a été observé par de nombreux groupes. Le mécanisme mis en jeu lors de cette étape fait intervenir notamment les extrémités N- et C-terminales de la protéine. L'hélice  $\alpha$ 1 de Bax est impliquée dans son

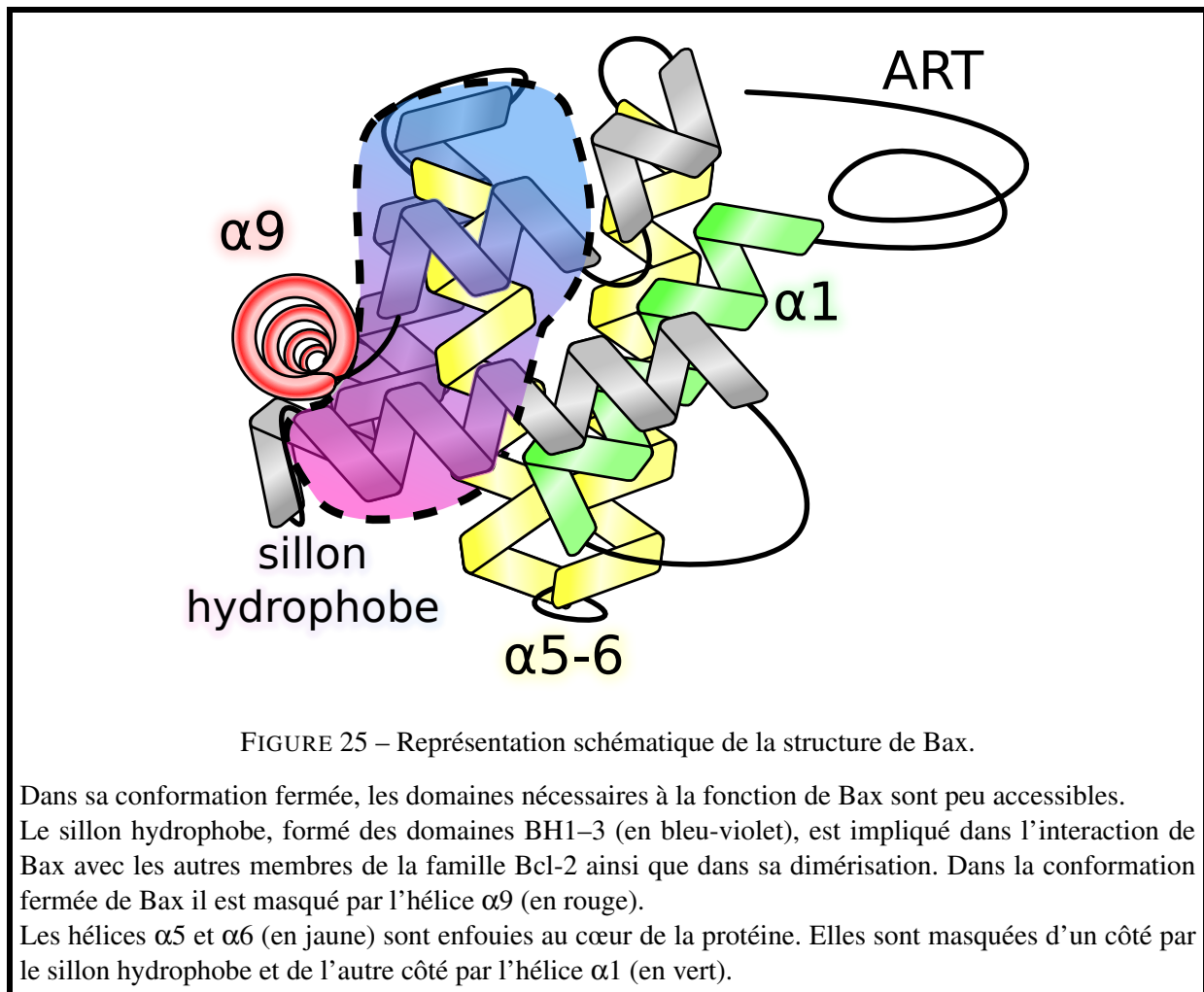
adressage vers la mitochondrie (Cartron *et al.*, 2002). À l'état natif, cette hélice est rendue inaccessible par la séquence des 19 premiers acides aminés de Bax nommée ART (apoptotic regulation of targeting) (Goping *et al.*, 1998; Cartron *et al.*, 2002). La libération de l'hélice  $\alpha 1$  est provoquée lorsque l'ART, qui est très mobile (Suzuki *et al.*, 2000), subit un changement de conformation (Arokium *et al.*, 2004; Cartron *et al.*, 2005). Le mouvement de la partie C-terminale est également corrélé à la libération de l'hélice  $\alpha 1$  (Kim *et al.*, 2009) et à l'adressage et l'activation de Bax (Arokium *et al.*, 2004). Cependant cette condition n'est pas suffisante pour entraîner une perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (Gilmore *et al.*, 2000; Lucken-Ardjomande *et al.*, 2008) et il semble que Bax doive subir un second changement de conformation pour acquérir une conformation favorable pour induire la perméabilisation. Le mutant S184A fortement mitochondrial mais peu actif est représentatif de cette double étape dans le processus d'activation de Bax. La mutation semble entraîner un changement de conformation qui serait suffisant à l'exposition des domaines impliqués dans l'adressage vers la mitochondrie mais pas à l'acquisition d'une conformation susceptible d'induire la perméabilisation de la membrane.

Le comportement du mutant S184D est plus complexe. Sans favoriser significativement l'adressage vers la mitochondrie, la mutation est responsable de l'activation de la fonction proapoptotique de Bax sur la mitochondrie, la membrane externe est perméabilisée et la majorité du cytochrome c est libérée. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce résultat.

La mutation S184D pourrait moduler l'interaction entre l'hélice  $\alpha 9$  et le sillon hydrophobe dans lequel elle repose. Elle pourrait empêcher la libération de l'hélice  $\alpha 9$  ainsi que celle de l'hélice  $\alpha 1$ , impliquée dans l'adressage vers la mitochondrie et dont la mobilité est associée à celle de l'hélice  $\alpha 9$  (Kim *et al.*, 2009). La limite de cette hypothèse est que dans ces conditions la protéine devrait acquérir une conformation active et notamment libérer les hélices  $\alpha 5$  et  $\alpha 6$ , situées au cœur de la protéine et candidates principales pour la formation du canal, or il est difficilement imaginable qu'un tel mouvement n'affecte pas la structure de la poche hydrophobe formée par les domaines BH1-3 et par conséquent la position de l'hélice  $\alpha 9$ . Aussi il peut être envisagé que la mutation induise un changement de conformation de la partie C-terminale de Bax et la libération partielle des domaines impliqués dans la perméabilisation mais que ce changement de conformation soit insuffisant pour promouvoir la libération de la partie N-terminale et l'adressage de Bax vers la mitochondrie (Figure 25).

Étant donné le caractère hydrophobe de l'hélice  $\alpha 9$ , il est également envisageable que la mutation puisse défavoriser l'insertion de cette hélice dans la membrane mitochondriale. Bien qu'elle ne soit pas indispensable à l'adressage de Bax l'hélice  $\alpha 9$  pourrait participer à l'établissement de sa conformation membranaire, il est notamment suggéré qu'elle participe à l'oligomérisation de Bax et à la formation du canal. Cependant nos observations montrent que Bax S184D est parfaitement capable d'entraîner la perméabilisation de la membrane externe.

L'expression de différents variants de Bax a mis en évidence que Bax S184D est systématiquement présente à des concentrations cellulaires inférieures à celles de la forme native ou du mutant S184A et ce malgré l'utilisation de différents clones transformés avec ce mutant. Dans l'hypothèse où la mutation S184D entraînerait un changement de conformation vers une forme ouverte, cette observation pourrait être expliquée par une plus grande instabilité de la protéine dont les différents domaines seraient alors plus facilement accessibles et dégradés. Cette hypothèse pourrait être confirmée en déterminant la demi-



vie de Bax par immunoprécipitation de la protéine sur des cultures marquées au  $^{35}\text{S}$  et récoltées après différents temps de chasse.

Par la suite les mutants S184A et S184D seront utilisés comme modèles d'une forme de Bax ayant subi respectivement un changement de conformation conduisant à l'adressage de la protéine vers la mitochondrie ou un changement de conformation activateur de la protéine et suffisant à induire la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe.

Il a été montré que Bax peut être spontanément phosphorylée lorsqu'elle est exprimée dans la levure et que cette phosphorylation est portée par la sérine 184 (Arokium *et al.*, 2007).

En premier lieu des expérimentations ont été réalisées en utilisant des souches de levure dépourvues des homologues des kinases connues pour induire la phosphorylation Bax chez l'homme ou la souris. La kinase Akt possède un homologue chez *Saccharomyces cerevisiae*, la kinase Sch9. GSK-3 $\beta$  possède quatre homologues, les kinases Mck1, Rim11, Mrk1 et Ygk3. Cependant cette approche s'est rapidement révélée peu adéquate. Tout d'abord les kinases de levure auxquelles nous nous sommes intéressés ne présentent qu'une homologie de fonction avec leurs équivalents animaux. L'absence d'homologie structurale fait que leurs substrats ne sont pas nécessairement reconnus par les kinases homologues. Par ailleurs, l'absence de données quantitatives concernant la phosphorylation spontanée de Bax dans la levure ne permet pas de juger de la pertinence de cette observation ; il se peut en effet que la proportion de protéines phosphorylées soit négligeable ou que la phosphorylation n'ait aucune incidence. Enfin la suppression des gènes de ces kinases affecte fortement la croissance et l'état physiologique général des levures.

Nous avons ainsi focalisé la suite de cette étude en exprimant les kinases humaines, tout comme Bax, de façon hétérologue. Les résultats qui suivent détaillent donc le comportement de Bax en présence des kinases humaines Akt et GSK-3 $\beta$ .

### 3 Étude du rôle de la protéine kinase Akt

#### 3.1 Clonage d'AKT1

L'ADN complémentaire du gène humain AKT1 codant pour la protéine Akt a été isolé d'un plasmide pcDNA et cloné dans le plasmide pCM189 afin de permettre l'expression de la protéine dans la levure. Akt est phosphorylable sur les résidus thréonine 308 et sérine 473 et sa phosphorylation est nécessaire à son activité kinase. L'activation constitutive de la protéine peut être obtenue en mimant la phosphorylation de ces résidus par une mutation en aspartate (Alessi *et al.*, 1996). Les simples mutants T308D et S473D ou le double mutant T308D/S473D ont été générés par mutagenèse dirigée afin d'exprimer une version constitutivement active d'Akt.

L'utilisation d'un promoteur régulable permet de réprimer l'expression d'Akt, par l'ajout de doxycycline dans le milieu de culture, lors de la transformation des levures et de la sélection des clones. Cette précaution a été nécessaire pour que les souches transformées puissent croître. Nous avons par ailleurs observé une inhibition de la croissance des souches transformées par Akt au bout de quelques jours. Ainsi les précultures sont systématiquement réalisées en présence de doxycycline et l'expression de la kinase n'est induite (par lavage des cellules et changement du milieu) que le temps nécessaire à l'expérimentation (sur la nuit).

### 3.2 Expression d'Akt chez la levure

L'expression d'Akt est ainsi induite après le retrait de la doxycycline. Les cellules sont lavées afin d'éliminer la doxycycline et cultivées en son absence pendant quelques heures avant l'induction de l'expression de Bax par l'ajout de galactose.

En premier lieu les deux simples mutants d'Akt ont été comparés en coexpression avec la forme native Bax ou avec le mutant S184A (Figure 26). La quantité de protéine détectée par western blot est supérieure pour le mutant S473D d'Akt, comparé au mutant T308D. Par la suite le mutant S473D a été utilisé pour étudier le rôle d'Akt sur la phosphorylation et la régulation de Bax. Aucune différence significative d'expression d'Akt n'a été observée entre les souche exprimant la forme native de Bax ou le mutant S184A.

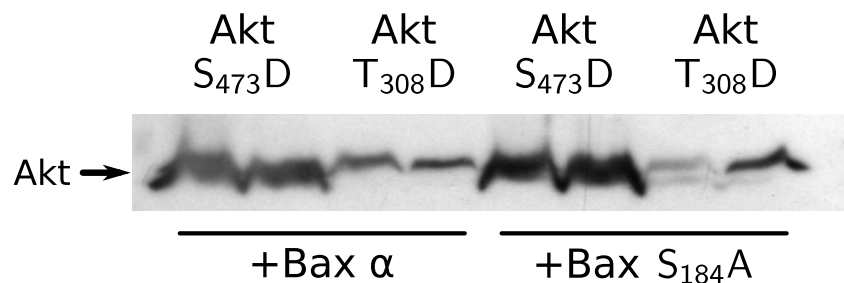


FIGURE 26 – Expression des mutants constitutivement actifs d'Akt dans la levure

L'expression des mutants constitutivement actifs d'Akt a été déterminée par immunodétection sur des extraits cellulaires de levures chez lesquelles la kinase humaine a été exprimée. Le mutant S473D a un niveau d'expression supérieur à celui du mutant T308D aussi bien en présence de la forme native de Bax que du mutant non phosphorylable de Bax, le mutant S184A.

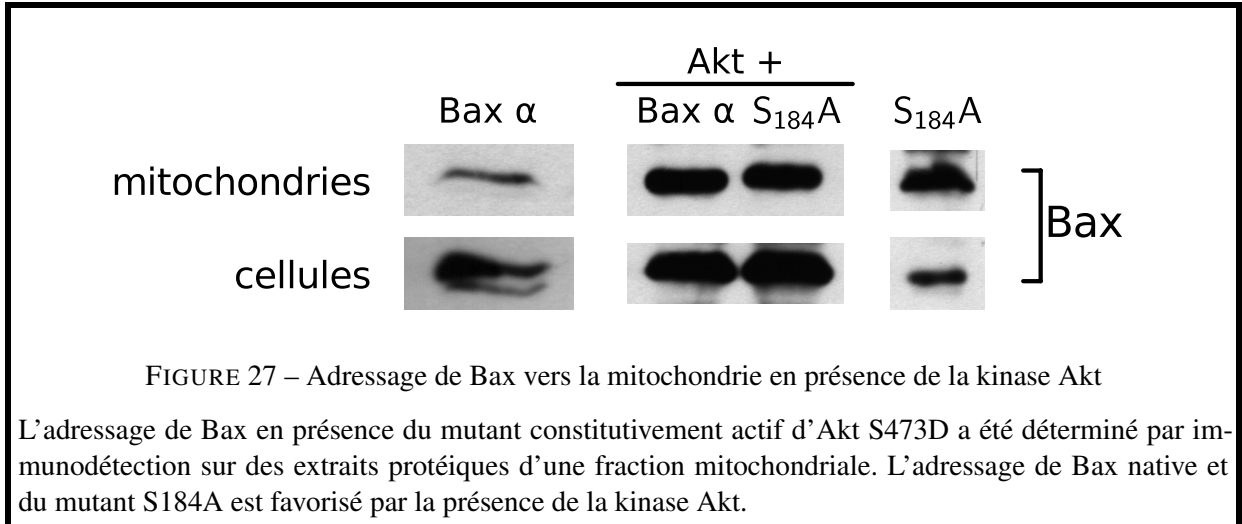
Malgré le faible niveau d'expression observé, une partie des expérimentations présentées par la suite a été réalisée en parallèle avec le mutant T308D. Aucun effet significatif sur l'adressage et l'activation de Bax n'a cependant été mis en évidence avec ce mutant.

### 3.3 Adressage vers la mitochondrie et insertion membranaire

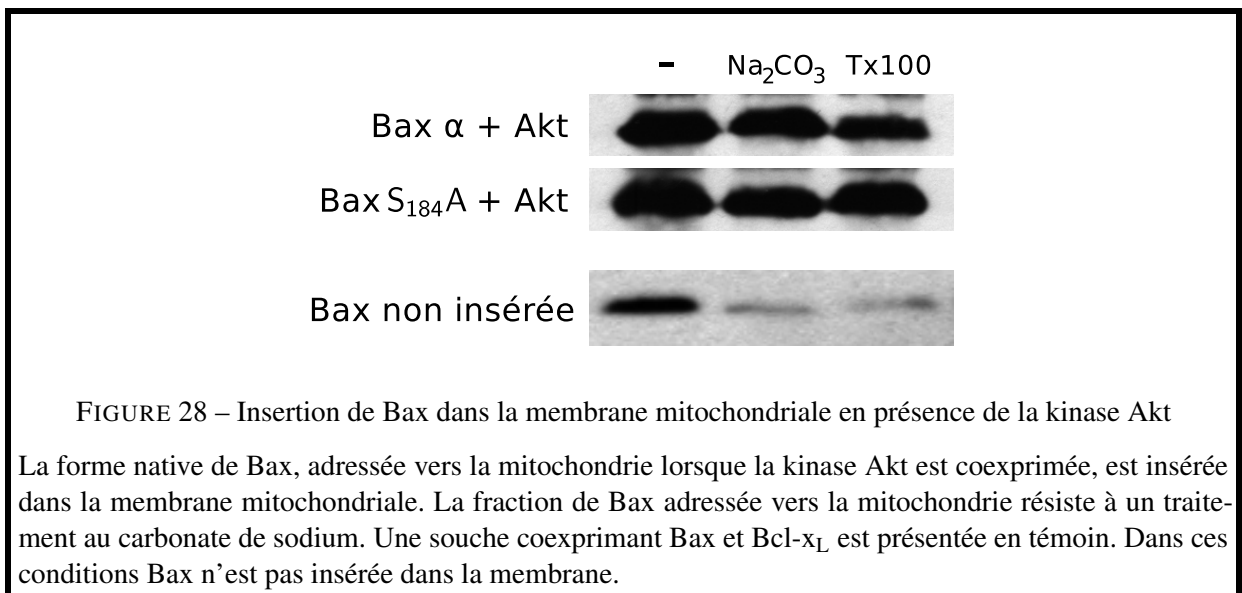
Exprimée sous sa forme native dans la levure, Bax est presque exclusivement cytosolique. Nous avons tout d'abord voulu caractériser l'influence d'une coexpression de la forme constitutivement active d'Akt (mutant S473D) sur la capacité de Bax à être relocalisée vers la mitochondrie. Pour cela des mitochondries ont été isolées à partir de souches exprimant Akt et différents variants de Bax. L'adressage de Bax a été déterminé qualitativement par western-blot.

La conséquence de l'expression d'Akt sur la forme native de Bax a été étudiée en comparaison du mutant S184A. Le mutant ne pouvant être phosphorylé sur le résidu 184, il constitue un témoin négatif de phosphorylation. Par ailleurs, ce mutant étant constitutivement mitochondrial, il constitue également un témoin positif d'adressage. Le niveau cellulaire global d'expression des deux variants de Bax est similaire.

En présence d'Akt, la forme native de Bax, normalement cytosolique, est adressée vers la mitochondrie d'une façon comparable à celle du mutant S184A (Figure 27).



La capacité de Bax à s'insérer dans la membrane mitochondriale a été caractérisée par un traitement avec un agent chaotrope (carbonate de sodium). Une forme de Bax non insérée dans la membrane est décrochée par un tel traitement. À l'inverse, en présence d'Akt, la forme native de Bax est capable de s'insérer dans la membrane mitochondriale et reste liée à la fraction mitochondriale en présence du carbonate de sodium (Figure 28).



Cette première approche visant à caractériser l'effet d'Akt sur Bax met en évidence que la kinase promeut l'adressage de Bax vers la mitochondrie et que la protéine est insérée dans la membrane mitochondriale.

Ce résultat peut sembler inattendu au premier abord, plusieurs équipes ayant en effet montré que la phosphorylation de Bax par Akt réprime sa translocation vers la mitochondrie (Gardai *et al.*, 2004; Xin

et Deng, 2005). Ces résultats ont cependant été obtenus dans un contexte cellulaire mammifère : Bax est alors présente dans un fond protéique complexe et son devenir dépend de nombreux acteurs (autres membres de la famille de Bcl-2, notamment). L'approche présentée ici est sensiblement différente, elle vise à déterminer les mécanismes moléculaires mis en œuvre par l'interaction entre Bax et Akt. La levure représente un contexte protéique simplifié, et notamment dépourvu d'un grand nombre d'acteurs de l'apoptose. Elle permet de mettre en évidence certaines des caractéristiques moléculaires non observables directement dans les études citées précédemment.

Ici, les résultats obtenus montrent que la présence d'Akt seule n'est pas suffisante pour réprimer la présence de Bax dans la fraction mitochondriale et qu'au contraire elle semble entraîner un changement de conformation suffisant à l'adressage de Bax et à son ancrage dans la membrane mitochondriale. La relocalisation de Bax vers la mitochondrie en présence d'Akt, dans la levure, alors qu'elle reste cytosolique dans des cellules animales semble indiquer que l'action d'Akt sur Bax n'inhibe pas directement la capacité de Bax à rejoindre la mitochondrie. Le fait que l'expression d'Akt entraîne l'adressage de Bax dans notre système d'étude est un indice que Bax pourrait changer de conformation. Il serait alors possible que d'autres protéines puissent interagir avec cette forme de Bax et inhiber sa translocation vers la mitochondrie dans les cellules animales.

### **3.4 Activation de Bax et perméabilisation de la membrane mitochondriale**

Les résultats précédents montrent que la forme native de Bax est relocalisée vers la mitochondrie lorsque la kinase Akt est coexprimée. Étant donné qu'un fort adressage mitochondrial n'est pas nécessairement corrélé à une perméabilisation importante de la membrane, nous avons voulu déterminer si la relocalisation de Bax observée en présence d'Akt était associée à un changement de conformation activateur de Bax. Les mutants S184A et S184D présentés précédemment sont de bons exemples de ce phénomène. Pour le mutant S184A, Bax est fortement adressée sans induire une forte libération du cytochrome c. À l'inverse le mutant S184D possède une capacité de perméabilisation de la membrane mitochondriale externe conduisant à une libération quasi totale du cytochrome c en dépit d'un faible adressage vers la mitochondrie.

La quantification des cytochromes mitochondriaux montre que la forme native de Bax est activée en présence d'Akt. Il reste très peu de cytochrome c dans la fraction mitochondriale. Le mutant S184A, utilisé ici comme témoin négatif ne pouvant être phosphorylé sur le résidu 184, ne voit pas sa capacité de perméabilisation de la mitochondrie augmenter. La proportion de cytochrome c résiduelle dans la fraction mitochondriale après expression de Bax reste inchangée en présence d'Akt (Figure 29).

Ces observations suggèrent que Bax change de conformation en présence d'Akt. Tout comme pour le mutant S184D, Bax s'insère dans la membrane et est activée.

Deux différences sont toutefois à noter entre les deux approches. Tout d'abord l'expression d'Akt favorise la localisation mitochondriale de Bax alors que le mutant phosphomimétique S184D est peu adressé. Cette observation sera discutée dans le point suivant. Il apparaît en effet que la kinase est elle-même en partie localisée dans la fraction mitochondriale, elle pourrait par conséquent participer directement à la reconnaissance de Bax au niveau de la membrane externe.

La seconde différence est que le mutant entraîne une perméabilisation légèrement supérieure à celle

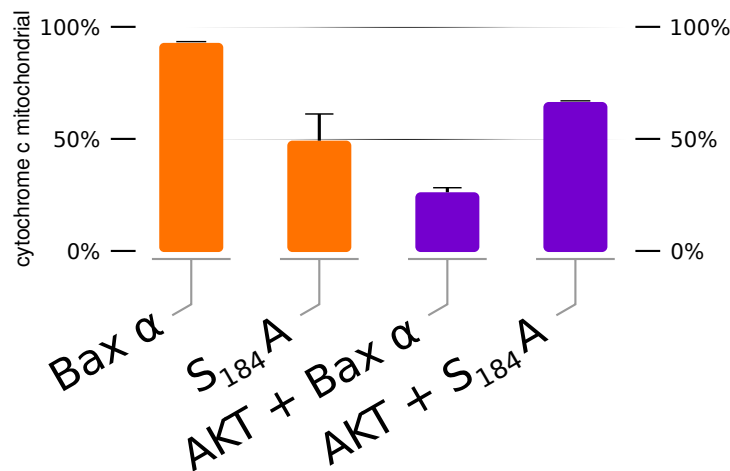


FIGURE 29 – Conséquence de la présence de la kinase humaine Akt sur l'activation de Bax et la libération du cytochrome c

La libération du cytochrome c a été déterminée par spectrophotométrie sur mitochondries isolées. La présence d'Akt n'influence pas la capacité du mutant non phosphorylable S184A à entraîner la perméabilisation de la membrane externe. En revanche la forme native de Bax, inactive lorsqu'elle est exprimée seule, est fortement activée par la présence d'Akt et entraîne une libération d'environ 75% de cytochrome c. Les mesures ont été effectuées sur au moins trois expériences indépendantes. Les barres d'erreur indiquent l'écart-type des mesures.

obtenue en présence d'Akt, en particulier en prenant en compte la quantité de Bax présente au niveau de la membrane. La libération du cytochrome c est totale pour le mutant alors que la quantité de Bax dans la fraction mitochondriale est relativement faible. Il faut toutefois bien considérer que les deux approches ne sont pas identiques. Alors qu'une mutation phosphomimétique est un événement irréversible et touchant la totalité des protéines, la phosphorylation par une kinase constitue un mécanisme plus fin. En effet seule une fraction de la population de protéines peut être phosphorylée et cette phosphorylation est éventuellement réversible, ce qui pourrait expliquer la différence obtenue.

Si l'on compare la propension de Bax à entraîner la libération du cytochrome c en présence d'Akt par rapport à celle du mutant S184A, il apparaît que seule la forme native est activée par Akt alors que les deux variants sont présents dans la fraction mitochondriale dans des proportions similaires. La mutation de la sérine 184 en alanine semble donc responsable de l'absence de la capacité de Bax à induire la libération complète du cytochrome c, suggérant que la phosphorylation par Akt a bien lieu sur ce résidu.

### 3.5 Localisation d'Akt

L'étude de la localisation de Bax en présence d'Akt a révélé que la kinase est elle-même présente dans la fraction mitochondriale (Figure 30).

Afin de déterminer de façon plus fine si Akt et Bax peuvent colocaliser dans la fraction mitochondriale et pour vérifier que les données obtenues ne correspondent pas à la présence des protéines dans les membranes contaminantes (d'autres membranes sont généralement copurifiées avec la fraction mitochondriale), nous avons déposé un échantillon de la fraction mitochondriale après purification sur un

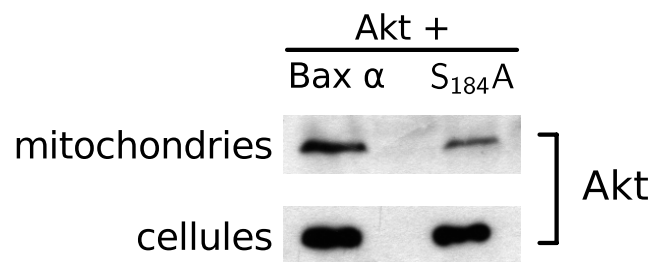


FIGURE 30 – Présence de la kinase Akt dans la fraction mitochondriale

La kinase Akt est localisée dans la fraction mitochondriale. La différence d'adressage entre la souche co-exprimant la forme native de Bax et celle co-exprimant le mutant S184A n'est pas significative. D'autres résultats peuvent montrer une tendance inverse.

gradient de saccharose et séparé les différentes membranes par ultracentrifugation. Après centrifugation, différentes fractions sont collectées et analysées par western blot (Figure 31).

Les résultats de la séparation montrent comme attendu une contamination par des membranes du réticulum endoplasmique (caractérisées par un anticorps dirigé contre la protéine DPMS). Akt et Bax sont présentes dans les mêmes fractions et selon un motif très similaire à celui de la protéine mitochondriale Cox2.

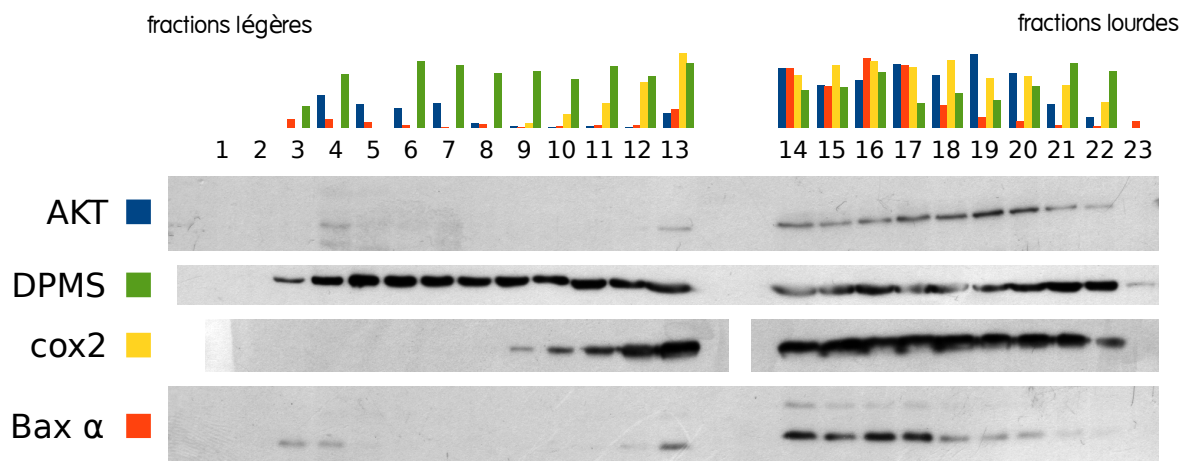


FIGURE 31 – Colocalisation de Bax et Akt dans la fraction mitochondriale

Le dépôt d'un échantillon de la fraction mitochondriale sur un gradient de sucrose permet la séparation des différentes membranes selon leur densité. Différentes fractions sont collectées puis déposées sur gels. Après transfert différentes protéines sont mises en évidence par immunodétection. Les membranes du réticulum endoplasmique sont caractérisées par un anticorps dirigé contre la protéine DPMS et les membranes mitochondriales par un anticorps dirigé contre la protéine cox2 (membrane interne). Akt et Bax sont localisées dans les mêmes fractions que cox2. Akt semble toutefois plus présente dans les fractions lourdes, correspondant à la membrane interne.

La localisation d'Akt dans la fraction mitochondriale a déjà été décrite. L'induction d'un stress, la présence d'IGF1 ou d'insuline provoque la phosphorylation d'Akt sur la thréonine 308 et la sérine 473 et sa translocation rapide (en une quinzaine de minutes) vers la mitochondrie. La kinase est non seulement présente dans la membrane externe mais elle est aussi importée dans la membrane interne et la matrice. Elle phosphoryle notamment la kinase GSK-3 $\beta$  mais également des protéines mitochondriales telles que la sous-unité  $\beta$  de l'ATP synthase. (Bijur et Jope, 2003b).

La localisation mitochondriale du mutant constitutivement actif S473D d'Akt que nous avons observée lorsque la kinase est exprimée chez la levure est en accord avec les données obtenues dans les cellules animales. Il est envisageable que cette localisation mitochondriale d'Akt puisse, indépendamment de toute phosphorylation, favoriser l'adressage de Bax vers la mitochondrie en agissant comme un récepteur. L'étude de la localisation de Bax en présence d'un mutant constitutivement inactif d'Akt (T308A/S473A) permettrait de vérifier cette hypothèse. Un effet similaire a déjà été observé pour la kinase PKC  $\alpha$ , qui favorise la localisation mitochondriale de Bax exprimée chez *Saccharomyces cerevisiae* sans que son activité kinase soit requise (Silva et al., en révision).

### 3.6 Discussion

L'étude du rôle d'Akt sur la protéine proapoptotique Bax chez la levure a permis de mettre en évidence un certain nombre de caractéristiques moléculaires non observables dans un modèle animal en raison de la présence d'un fond de signalisation apoptotique complexe.

Plusieurs équipes ont démontré le rôle antiapoptotique d'Akt et plus particulièrement son effet sur l'adressage de Bax qui reste cytosolique lorsque la kinase est stimulée et que Bax est phosphorylée sur la sérine 184 (Gardai *et al.*, 2004; Xin et Deng, 2005). Aucun mécanisme expliquant cette observation n'avait toutefois été établi. L'équipe de Richard Youle a démontré l'importance du résidu 184 (Nechush-tan *et al.*, 1999) et les travaux réalisés au laboratoire ont révélé que la modification de ce résidu est en elle-même capable de moduler le comportement de Bax et ceci dans un contexte cellulaire dépourvu des partenaires classiques de la protéine (Arokium *et al.*, 2007).

Les résultats présentés ici montrent qu'Akt coexprimée seule avec Bax n'est pas capable de réprimer sa fonction proapoptotique. À l'inverse la forme native de Bax, cytosolique en l'absence d'Akt, est adressée vers la mitochondrie et induit une forte libération du cytochrome c. Il semble donc qu'Akt n'induit pas directement une inhibition de l'adressage de Bax ou de la perméabilisation de la membrane mitochondriale mais plutôt un changement de conformation de Bax. Ce changement de conformation est traduit dans notre système rapporteur par une activation de Bax et la libération du cytochrome c. Dans les cellules animale, d'autres acteurs seraient donc requis pour l'inhibition de Bax après le changement de conformation de Bax induit par Akt.

Le mutant de Bax S184A, qui mime une forme non phosphorylable de Bax sur le résidu 184, n'est quasiment pas affecté par la présence d'Akt. Il subit une légère augmentation de son adressage mais sans aucune influence sur sa capacité à perméabiliser la membrane externe et à provoquer la libération du cytochrome c. Cette observation indique tout d'abord que l'action d'Akt sur Bax est dépendante du résidu 184, la forme native pouvant être activée par la présence d'Akt mais pas le mutant. Il en découle également que la substitution de la sérine en alanine, bien qu'ayant un effet stimulateur sur l'adressage

de Bax, induit le blocage du processus d'activation de telle sorte qu'en dépit d'une forte localisation mitochondriale le mutant reste peu favorable à la perméabilisation de la membrane mitochondriale.

L'hypothèse présentant la phosphorylation de Bax par Akt comme un évènement déclencheur d'un changement de conformation pourrait également expliquer l'observation selon laquelle la stimulation d'Akt s'accompagne d'une diminution de la demi-vie de Bax (Xin et Deng, 2005). En effet la conformation ouverte de Bax, correspondant à la forme pour laquelle sont libérés les domaines terminaux, peut être un facteur influençant sa stabilité et sa dégradation. Les résultats obtenus avec le mutant phosphomimétique S184D étayaient cette hypothèse, la quantité cellulaire de Bax détectée pour ce mutant (dont la conformation est vraisemblablement ouverte) étant systématiquement inférieure à celle des formes cytosoliques inactives (conformation fermée) ou membranaires (protéines dépliées mais stabilisées ou moins accessibles aux facteurs de dégradation).

Le comportement de Bax en présence d'Akt, bien que présentant des similitudes avec celui du mutant S184D n'est pas parfaitement identique. Dans les deux cas Bax induit une forte libération du cytochrome c ; cependant lors de la coexpression de Bax et de la kinase, Bax est fortement adressée vers la mitochondrie. Par ailleurs, le mutant induit une libération de cytochrome c plus importante que la protéine native en présence d'Akt. Cette différence peut être expliquée par le fait que l'approche utilisant le mutant phosphomimétique ne reflète pas complètement la réalité d'une phosphorylation. En premier lieu la différence entre un aspartate et une sérine phosphorylée peut jouer sur le changement de structure. En second lieu la nature même de la mutation rend impossible toute modulation de la modification chez le mutant. En effet la mutation en aspartate touche nécessairement la totalité des protéine Bax et n'est pas réversible là où une kinase peut ne toucher qu'une fraction des protéines et entraîner une modification réversible de la protéine.

La colocalisation de Bax et d'Akt dans la fraction mitochondriale et la différence d'adressage en comparaison du mutant S184D pose la question d'un rôle direct de la kinase dans l'adressage de Bax vers la mitochondrie. Étant donné la localisation mitochondriale de la forme active d'Akt, il pourrait être envisagé que la kinase puisse servir de récepteur mitochondrial et favoriser l'adressage de Bax du fait de leur interaction, indépendamment de toute modification de Bax. L'utilisation d'un mutant inactif d'Akt, le double mutant T308A/S473A, permettrait de répondre à cette interrogation. Dans le cas où le rôle d'Akt sur l'adressage de Bax ne serait porté que par l'interaction entre les protéines, l'adressage ne devrait pas être affecté par le mutant de la kinase.

Enfin il reste à déterminer si des partenaires connus de Bax tels que la protéine antiapoptotique Bcl-x<sub>L</sub> ou encore la protéine 14-3-3 (dont certains substrats sont reconnus sous leur forme phosphorylée) voient leur affinité pour Bax modifiée en présence d'Akt et sont capables d'inhiber la perméabilisation de la mitochondrie.

## 4 Étude du rôle de la protéine kinase GSK-3 $\beta$

### 4.1 Clonage et expression de GSK-3 $\beta$ chez la levure

L'ADNc codant pour la protéine kinase GSK-3 $\beta$  a été cloné dans le plasmide pGAD424 sous le contrôle du promoteur ADH1.

L'expression de GSK-3 $\beta$  est constitutive grâce au promoteur ADH1. La forme de GSK-3 $\beta$  phosphorylée sur sa sérine 9 est inactive ; cependant lorsqu'elle est exprimée chez *Saccharomyces cerevisiae*, GSK-3 $\beta$  est active et n'affecte pas la croissance de la levure (Andoh *et al.*, 2000). Nous avons donc exprimé la forme native de la kinase et dans un premier temps vérifié son expression et son état de phosphorylation. Un extrait de protéines cellulaires d'une souche exprimant la kinase humaine a été réalisé et GSK-3 $\beta$  détectée soit par un anticorps reconnaissant les différentes formes de la protéine, soit par un anticorps spécifique de la forme phosphorylée sur la sérine 9 (forme inactive).

Les résultats indiquent que GSK-3 $\beta$  est bien exprimée chez la levure. Un léger signal est obtenu avec l'anticorps reconnaissant la forme phosphorylée indiquant qu'au moins une fraction de la kinase est inactive. (Figure 32)

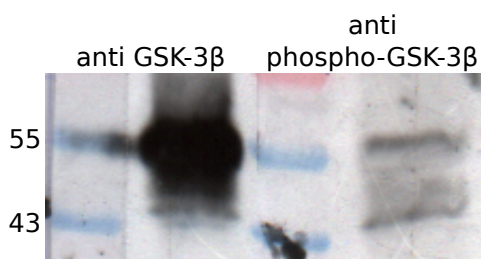


FIGURE 32 – Expression de la kinase humaine GSK-3 $\beta$  dans la levure

La kinase humaine GSK-3 $\beta$  a été exprimée dans la levure. Un extrait cellulaire a été déposé sur gel d'acrylamide, transféré sur membrane et GSK-3 $\beta$  a été détectée soit par un anticorps anti-GSK-3 $\beta$  soit par un anticorps spécifique de la forme phosphorylée sur la sérine 9 (forme inactive).

### 4.2 Effet de GSK-3 $\beta$ sur le caractère mitochondrial de Bax

GSK-3 $\beta$  peut phosphoryler Bax sur la sérine 163. Dans les conditions favorisant cette phosphorylation (absence de facteurs trophiques), il a été montré une activation de l'apoptose associée à une relocalisation de Bax vers la mitochondrie et à la libération du cytochrome c (Linseman *et al.*, 2004). Une première approche moléculaire d'étude du rôle de la sérine 163 a été réalisée par mutagenèse dirigée en exprimant Bax dans la levure. La mutation de ce résidu en aspartate n'entraîne pas de changement de comportement majeur de la protéine qui reste quasiment absente de la fraction mitochondriale et peu active. En revanche la mutation est capable d'induire l'activation d'une forme inactive de Bax dont la stabilité de la conformation fermée a été altérée par une double mutation. Le remplacement de la proline 168 en alanine (P168A) permet une mobilité de l'hélice  $\alpha$ 9 et active fortement l'adressage de Bax vers la

mitochondrie et la libération du cytochrome c. L'addition d'une seconde mutation remplaçant la sérine 60 en alanine (P168A/S60A) stabilise cette forme de Bax *via* une interaction accrue entre les hélices  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  et permet de restaurer une forme non mitochondriale et inactive de Bax. La substitution additionnelle de la sérine 163 par un aspartate (P168A/S60A/S163D) engendre un mutant mitochondrial capable de libérer le cytochrome c. (Figure 33 ; Arokium *et al.*, 2007).

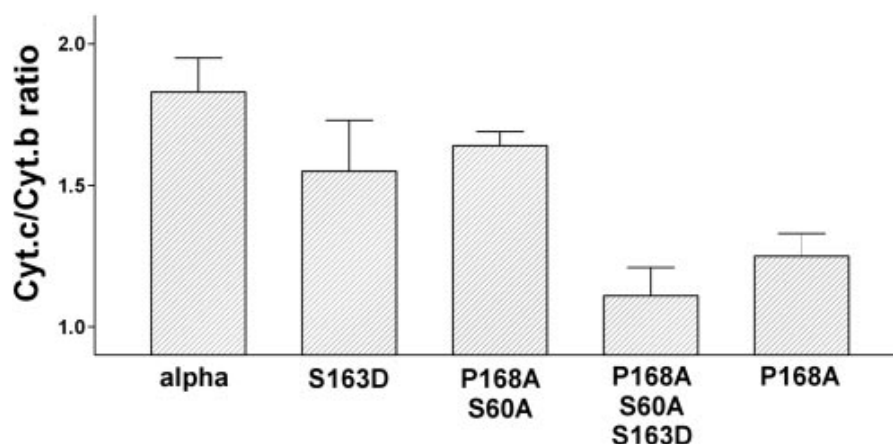


FIGURE 33 – Étude du rôle de la sérine 163 par une approche phosphomimétique

Bax native est inactive. La mutation P168A entraîne l'activation de Bax et la libération de plus de 80% du cytochrome c en favorisant le mouvement de l'hélice  $\alpha 9$ . L'ajout mutation S60A permet de stabiliser le mutant P168A et restaure l'inactivité de Bax. La mutation S163D qui mime la phosphorylation de la sérine 163 permet d'activer le mutant P168A/S60A mais pas Bax native. (Arokium *et al.*, 2007) Les résultats sont présentés dans l'article en rapport du cytochrome c sur le cytochrome b. Un rapport de 1 correspond à une libération totale du cytochrome c et un rapport de 2 à l'absence de libération.

La forme native de Bax et le mutant inactivé P168A/S60A ont été utilisés afin de déterminer l'influence de GSK-3 $\beta$  sur la localisation mitochondriale de Bax. Le mutant S184A a servi de témoin positif d'adressage de la protéine vers la mitochondrie. Des extraits mitochondriaux ont été préparés à partir de souches coexprimant les différents variants de Bax et GSK-3 $\beta$ . (Figure 34)

Aussi bien la forme native que le mutant P168A/S60A de Bax, tous deux non mitochondriaux lorsqu'exprimés seuls, sont fortement adressés vers la mitochondrie en présence de GSK-3 $\beta$ . Le caractère membranaire des différents variants a été caractérisé par un traitement des fractions mitochondriales. La protéine native et le mutant sont tout deux insérés dans la membrane et résistent à l'incubation avec le carbonate de sodium.

Tout comme cela a été observé lors de la coexpression avec la kinase Akt, GSK-3 $\beta$  joue un rôle sur le caractère mitochondrial de Bax et favorise l'adressage et l'insertion de la forme native de Bax, aussi bien que du mutant P168A/S60A.

Ces premiers résultats obtenus avec le mutant Bax P168A/S60A sont en accord avec ceux obtenus en utilisant l'approche des mutants phosphomimétiques. Tout comme la mutation S163D, la présence de GSK-3 $\beta$  favorise l'adressage du mutant P168A/S60A. Concernant la forme native de Bax, les résultats obtenus sont différents. La mutation phosphomimétique S163D n'a aucun effet sur Bax alors que la

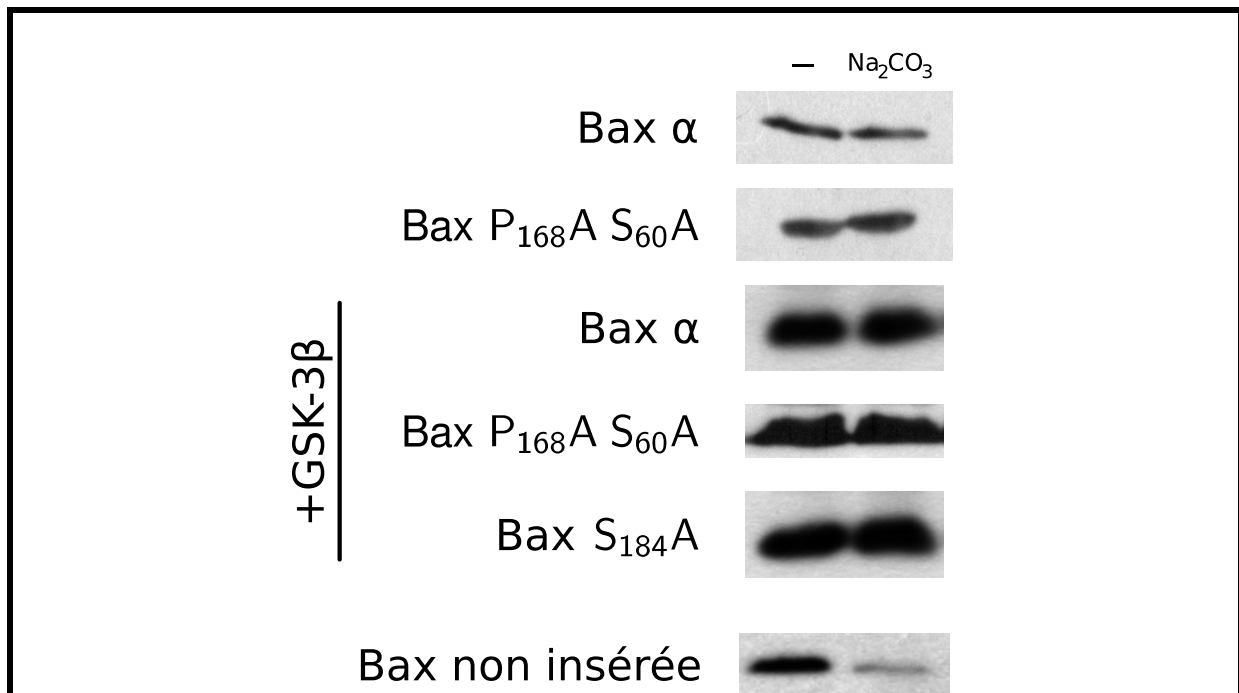


FIGURE 34 – Localisation mitochondriale et insertion de différents variant de Bax en présence de la kinase humaine GSK-3 $\beta$

La localisation mitochondriale et l'insertion dans la membrane externe de la forme native de Bax et du mutant P168A/S60A ont été déterminées sur mitochondries isolées. La présence de GSK-3 $\beta$  favorise l'adressage de la forme native de Bax ainsi que du mutant P168A/S60A. Bax est insérée dans la membrane mitochondriale en présence de GSK-3 $\beta$  comme le montre la résistance à un traitement au carbonate de sodium. Une souche coexprimant Bax et Bcl-x<sub>L</sub> est également présentée comme témoin non inséré dans la membrane mitochondriale.

coexpression de GSK-3 $\beta$  favorise sa localisation mitochondriale. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette observation. Le mutant phosphomimétique peut ne pas mimer parfaitement la phosphorylation et ne pas entraîner un changement de conformation suffisant à l'adressage de Bax. Il est également possible que GSK-3 $\beta$  favorise indirectement la localisation mitochondriale de Bax indépendamment de toute phosphorylation. De même que pour Akt, l'utilisation du mutant constitutivement inactif GSK-3 $\beta$  S9D permettrait de déterminer si le rôle de GSK-3 $\beta$  sur l'adressage de Bax vers la mitochondrie est dépendant ou non de la phosphorylation de Bax. Enfin d'autres résidus de Bax encore non identifiés pourraient être substrats de GSK-3 $\beta$ .

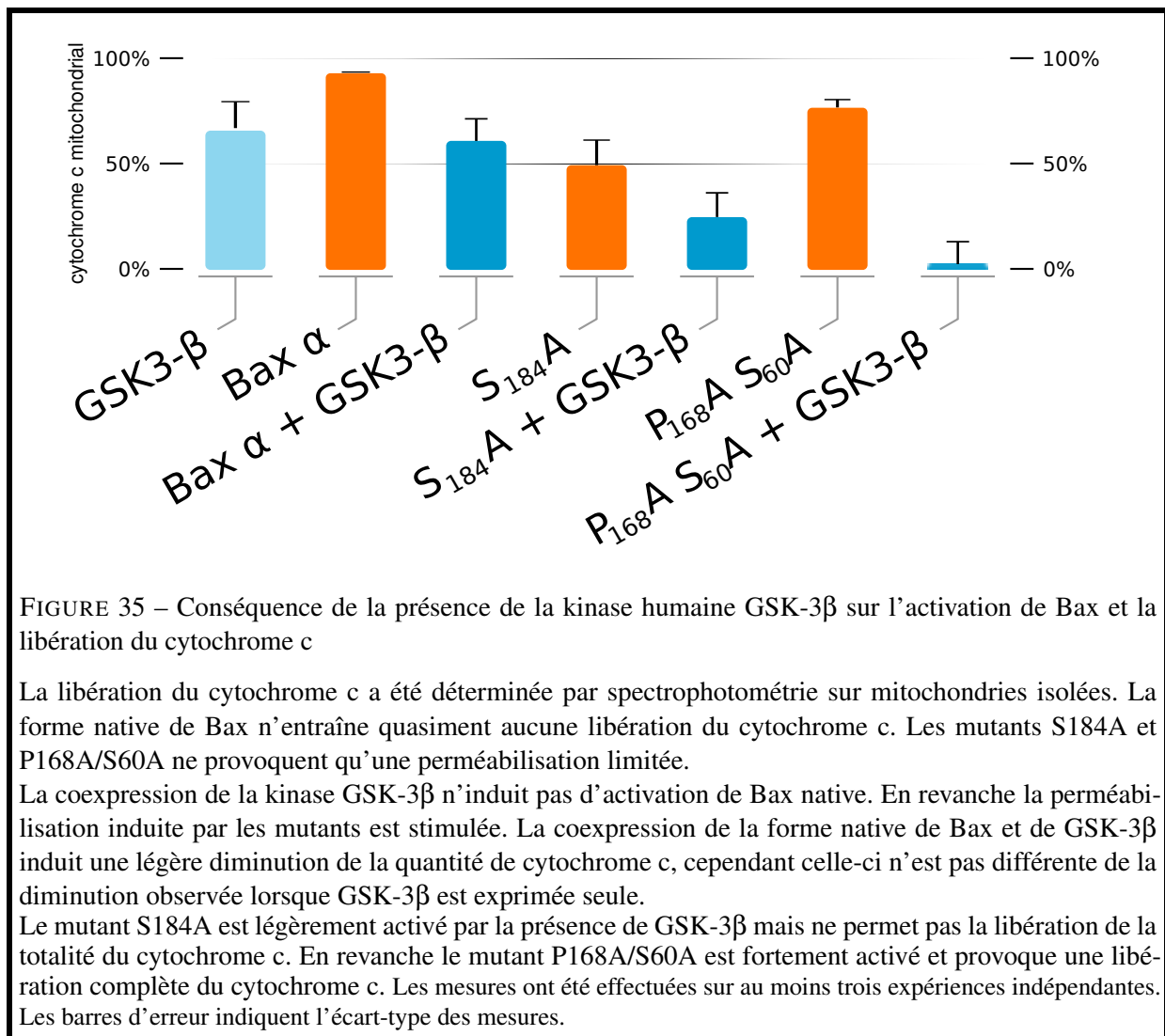
### 4.3 Activation de Bax et perméabilisation

Étant donné l'effet de GSK-3 $\beta$  sur le caractère mitochondrial de Bax, nous avons cherché à déterminer si la membrane était perméabilisée. La mutation S163D et l'expression de GSK-3 $\beta$  ont le même effet sur le mutant P168A/S60A ; en revanche ils ont un effet différent sur la souche sauvage. La présence de la kinase, mais pas la mutation phosphomimétique, favorise l'adressage de Bax native vers la mitochondrie. La question se posant donc est de savoir si l'adressage de Bax ou du mutant P168A/S60A induit par la présence de GSK-3 $\beta$  est suffisant pour promouvoir l'activation complète de Bax et la libération du cytochrome c.

La quantification des cytochromes mitochondriaux révèle qu'il n'y a pas de corrélation entre la présence de Bax  $\alpha$  dans la mitochondrie et la capacité de perméabilisation (Figure 35). Alors que l'adressage de la forme native de Bax est stimulé en présence de GSK-3 $\beta$ , aucune diminution significative du cytochrome c résiduel dans la fraction mitochondriale n'a été observée en comparaison avec la souche témoin exprimant seulement GSK-3 $\beta$ . Ce comportement est très similaire à celui du mutant de Bax S163D, mimant la phosphorylation de la sérine 163, qui est peu inactif (Arokium *et al.*, 2007) (Figure 33).

Pour le mutant P168A/S60A, le comportement observé est différent. Alors que sa capacité de perméabilisation est très faible en l'absence de GSK-3 $\beta$ , la coexpression de la kinase induit une forte relocalisation du cytochrome c, la quantité mitochondriale de cytochrome c résiduelle détectée dans la fraction mitochondriale étant fortement diminuée.

La coexpression de GSK-3 $\beta$  et du mutant S184A permet d'apporter des informations supplémentaires sur les mécanismes d'activation de Bax. Le mutant S184A est relativement peu actif lorsque l'on considère le fait que la protéine est fortement adressée vers la mitochondrie. La coexpression de GSK-3 $\beta$  favorise la libération du cytochrome c induite par le mutant S184A indiquant ainsi que ce variant de Bax est susceptible d'être activé davantage. Toutefois la libération du cytochrome c induite par Bax S184A en présence de GSK-3 $\beta$ , bien que supérieure à celle obtenue avec le mutant seul, reste toujours incomplète. Cette observation renforce l'idée selon laquelle la mutation S184A induit un blocage du processus d'activation de Bax. En comparaison, le mutant P168A/S60A entraîne une libération quasi-totale du cytochrome c lorsque GSK-3 $\beta$  est exprimée alors que seul il n'est que peu actif.



#### 4.4 Localisation de GSK-3 $\beta$

Le mutant S163D, qui mime la phosphorylation de la sérine 163, est très peu adressée vers la mitochondrie (Arokium *et al.*, 2007). En comparaison, les données présentées précédemment montrent que la forme native de Bax est fortement mitochondriale en présence de la kinase GSK-3 $\beta$ .

GSK-3 $\beta$  est connue comme pouvant être mitochondriale. Cette localisation est notamment associée à une augmentation de l'activité de la kinase. (Bijur et Jope, 2003a). L'expression hétérologue de la kinase GSK-3 $\beta$  humaine dans la levure ne semble pas modifier cette propriété. Nous avons en effet pu détecter la présence de GSK-3 $\beta$  dans la fraction mitochondriale. De plus, la kinase peut être insérée dans la membrane mitochondriale et résister à un traitement au carbonate de sodium, cependant cette observation n'a pas été systématique. (Figure 36)

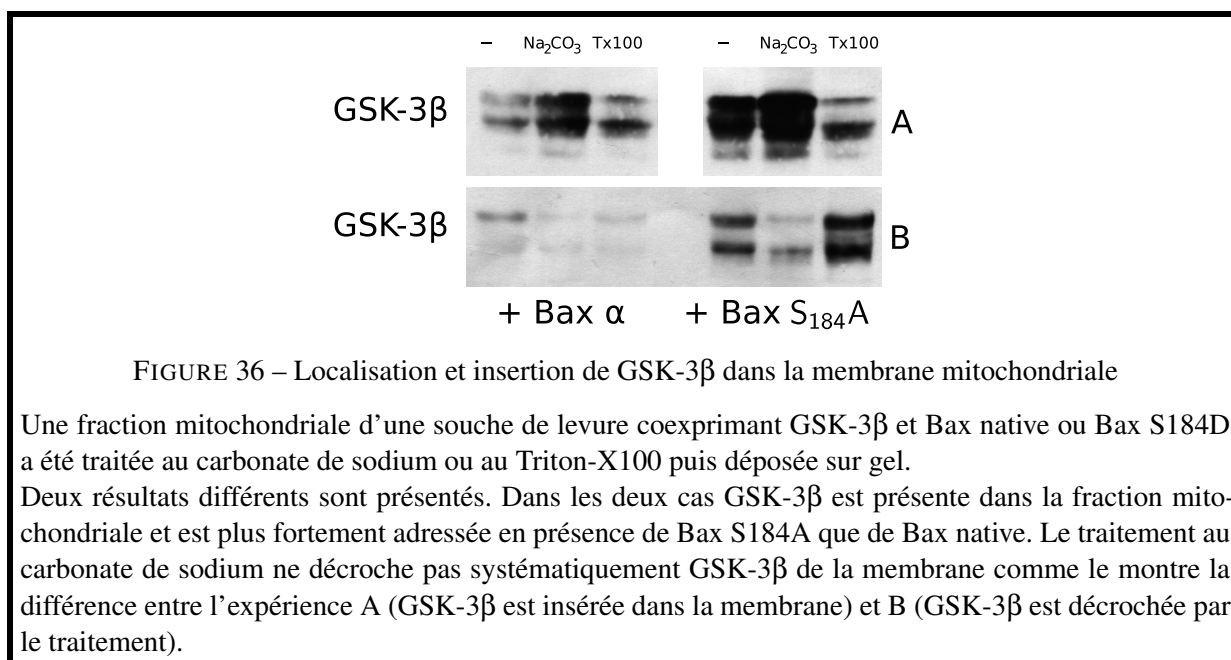


FIGURE 36 – Localisation et insertion de GSK-3 $\beta$  dans la membrane mitochondriale

Une fraction mitochondriale d'une souche de levure coexprimant GSK-3 $\beta$  et Bax native ou Bax S184D a été traitée au carbonate de sodium ou au Triton-X100 puis déposée sur gel.

Deux résultats différents sont présentés. Dans les deux cas GSK-3 $\beta$  est présente dans la fraction mitochondriale et est plus fortement adressée en présence de Bax S184A que de Bax native. Le traitement au carbonate de sodium ne décroche pas systématiquement GSK-3 $\beta$  de la membrane comme le montre la différence entre l'expérience A (GSK-3 $\beta$  est insérée dans la membrane) et B (GSK-3 $\beta$  est décrochée par le traitement).

Les localisations de GSK-3 $\beta$  et de Bax ont été déterminées de manière plus fine en déposant des extraits mitochondriaux sur un gradient de saccharose (Figure 37). Cette observation permet de discriminer les éventuelles contaminations par d'autres membranes telles que celles du réticulum endoplasmique. Le gradient montre en effet une contamination de la fraction mitochondriale purifiée par des membranes du réticulum, caractérisées par la détection de la protéine DPMS. GSK-3 $\beta$  est détectée dans la plupart des fractions cependant la quantification des signaux indique qu'elle est principalement présente dans les fractions contenant également Bax et le marqueur mitochondrial cox2.

De façon intrigante la quantité mitochondriale de GSK-3 $\beta$  semble plus importante en présence d'un variant adressé de Bax qu'en présence de la forme native (Figure 36).

Tout comme chez l'homme, la kinase GSK-3 $\beta$ , lorsqu'elle est exprimée dans la levure, est en partie mitochondriale. Le fait que GSK-3 $\beta$  puisse s'insérer dans la membrane mitochondriale reste à confirmer. La forme native ou le mutant P168A/S60A colocalisent avec GSK-3 $\beta$  dans la fraction mitochondriale. Il a été montré précédemment que GSK-3 $\beta$  favorise l'adressage de ces variants de Bax vers la mitochondrie.

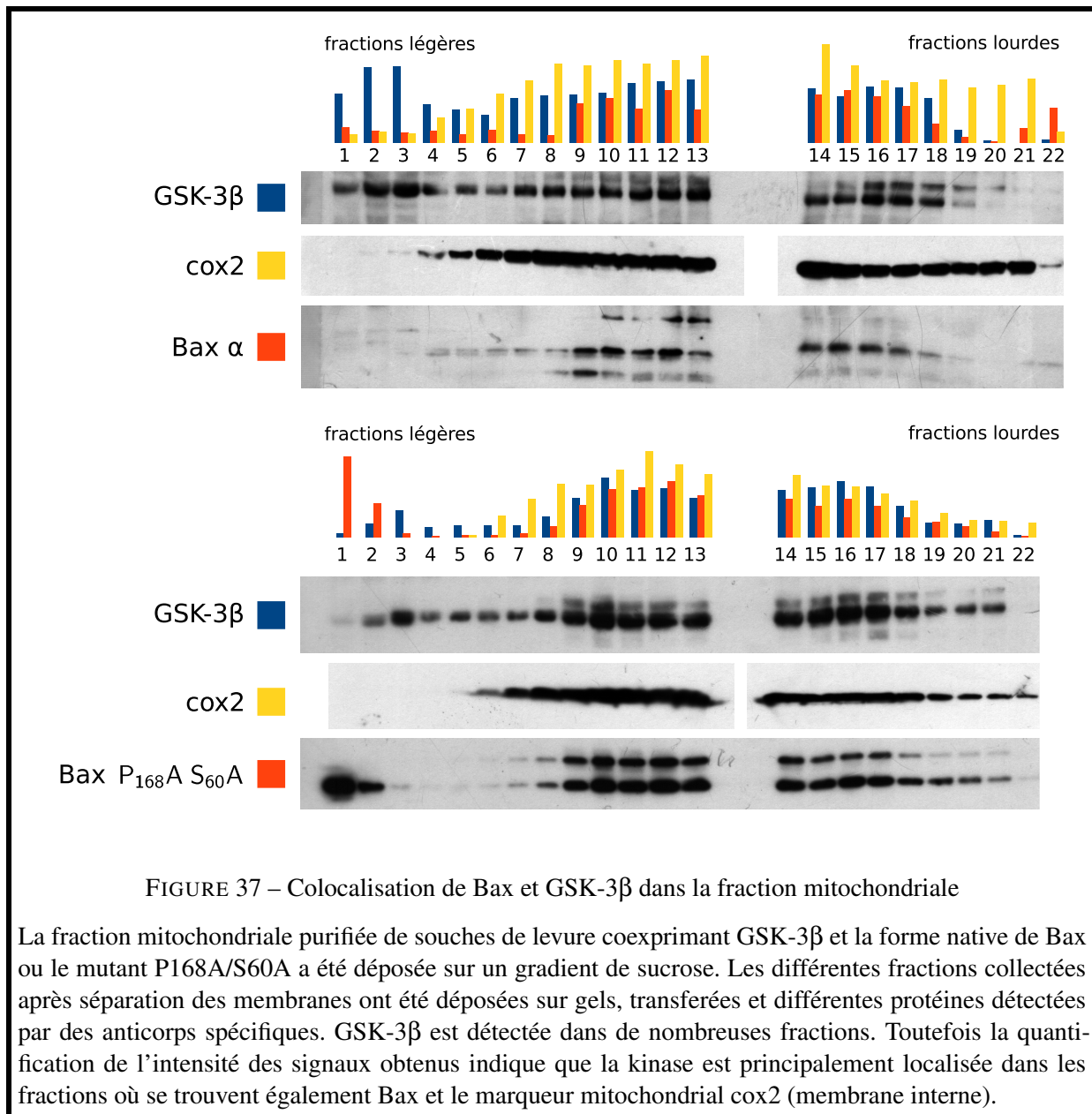


FIGURE 37 – Colocalisation de Bax et GSK-3 $\beta$  dans la fraction mitochondriale

La fraction mitochondriale purifiée de souches de levure coexprimant GSK-3 $\beta$  et la forme native de Bax ou le mutant P168A/S60A a été déposée sur un gradient de sucrose. Les différentes fractions collectées après séparation des membranes ont été déposées sur gels, transférées et différentes protéines détectées par des anticorps spécifiques. GSK-3 $\beta$  est détectée dans de nombreuses fractions. Toutefois la quantification de l'intensité des signaux obtenus indique que la kinase est principalement localisée dans les fractions où se trouvent également Bax et le marqueur mitochondrial cox2 (membrane interne).

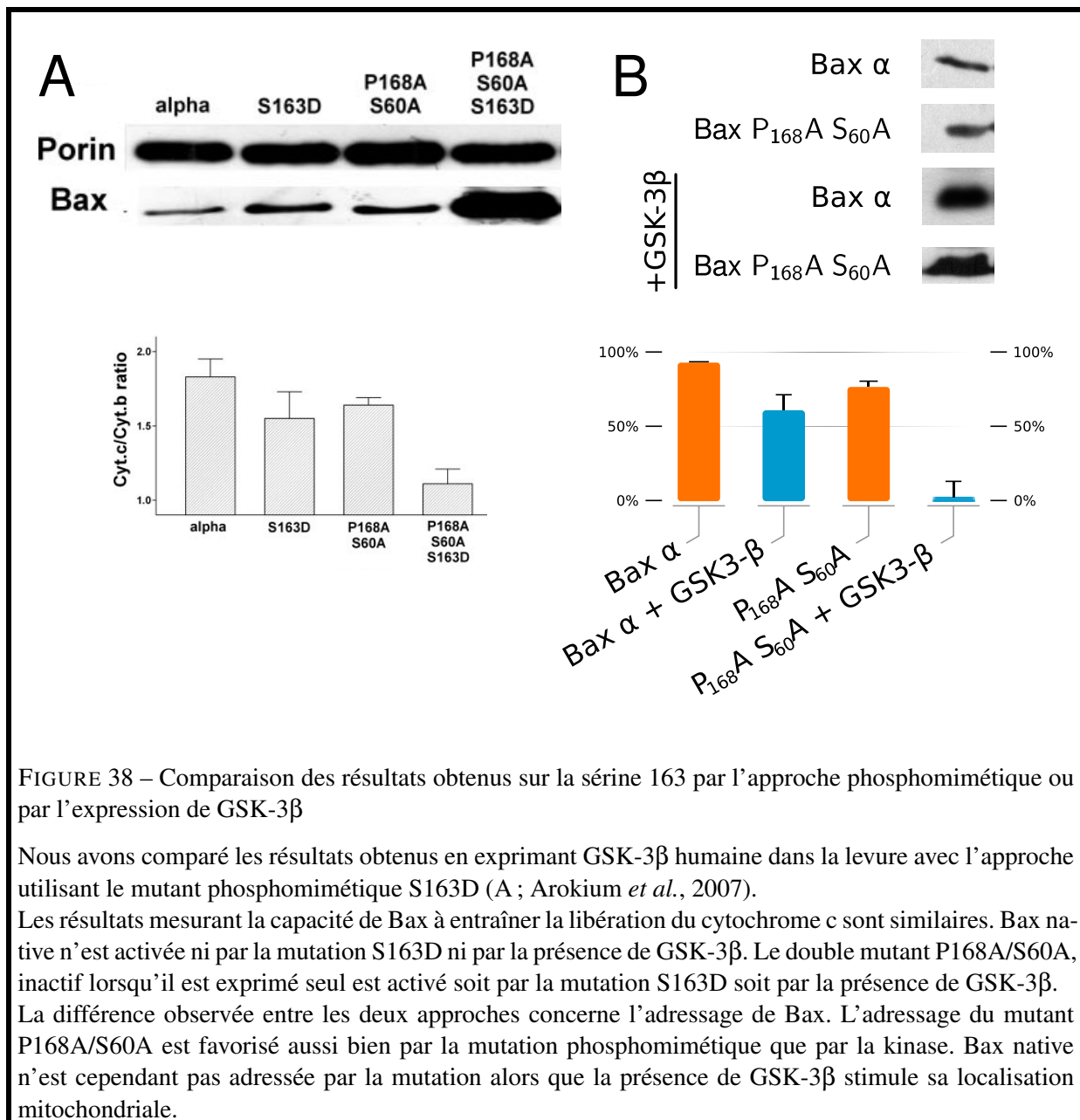
La présence de GSK-3 $\beta$  dans la mitochondrie pourrait participer directement à l'adressage de Bax vers le compartiment mitochondrial, indépendamment de sa fonction kinase.

## 4.5 Discussion

En présence de GSK-3 $\beta$ , Bax subit une activation partielle. La forme native de Bax est relocalisée vers la mitochondrie lorsque la kinase est exprimée mais reste incapable d'entraîner la libération du cytochrome c. De même le mutant S184A, déjà fortement mitochondrial ne subit qu'une légère activation lorsque GSK-3 $\beta$  est coexprimée. Le fait que ce mutant soit peu actif au regard du rapport entre le cytochrome c libéré et la quantité de Bax présente dans la fraction mitochondriale suggère que la légère augmentation de la libération du cytochrome c observée ne soit due qu'à une augmentation de la quantité de Bax adressée vers la mitochondrie et non à une augmentation de l'efficacité de Bax pour induire la perméabilisation de la membrane mitochondriale. En d'autres termes il semble que la perméabilisation mitochondriale observée dans la souche coexprimant GSK-3 $\beta$  et le mutant S184A de Bax soit principalement due à la quantité très importante de Bax présente dans le compartiment mitochondrial et non directement à un changement de conformation activateur de Bax.

Le mutant P168A/S60A a un comportement différent mais soutient les mêmes conclusions. Peu adressé et inactif lorsqu'il est exprimé seul, il devient mitochondrial et capable de promouvoir une libération totale du cytochrome c en présence de GSK-3 $\beta$ . Cette observation est également concordante avec les données obtenues en utilisant le triple mutant P168A/S60A/S163D mimant la phosphorylation de la sérine 163 (Figure 38). Le fait que GSK-3 $\beta$  favorise aussi bien l'adressage de la forme native de Bax que du mutant P168A/S60A mais que seul ce dernier soit en mesure d'entraîner la libération du cytochrome c indique que l'étape régulée par la kinase est principalement l'adressage de Bax vers la mitochondrie. Il est probable que le mutant P168A/S60A ait une propension à basculer dans une conformation active mais que cette activation soit bloquée par l'absence d'adressage vers la mitochondrie. En favorisant cette étape, GSK-3 $\beta$  ou la mutation phosphomimétique de la sérine S163 assureraient une activation complète de Bax.

Ces observations suggèrent donc que GSK-3 $\beta$  joue effectivement un rôle dans le processus d'activation de Bax. La kinase contrôlerait la phase d'adressage de Bax vers la mitochondrie en provoquant un premier changement de conformation. Toutefois bien que les domaines nécessaires à l'adressage de Bax soient libérés, il apparaît que ce changement de conformation est incomplet et ne permet pas, sans signaux activateurs complémentaires, de provoquer la perméabilisation de la membrane mitochondriale.



## 5 Caractérisation de la phosphorylation de Bax

La phosphorylation directe de Bax par Akt et GSK-3 $\beta$  n'a pu être mise en évidence ni par le traitement des protéines par l'utilisation de l'anticorps anti-phosphosérine 7F12. Cet anticorps avait été utilisé pour mettre en évidence la phosphorylation de Bax sur la sérine 184 dans les cellules animales (Gardai *et al.*, 2004). L'anticorps anti-phosphosérine utilisé possède une demi-vie très courte et est relativement peu sensible ce qui rend son utilisation très délicate. Dans nos conditions expérimentales il est également difficile de différencier la forme phosphorylée de Bax de la forme non phosphorylée par électrophorèse. La déphosphorylation de Bax par une phosphatase n'a donc pas donné de résultats concluants. La différence entre les résultats obtenus avec la forme native de Bax et le mutant non phosphorylable S184A suggère toutefois qu'il y ait bien une modification du résidu. L'état de phosphorylation du résidu restera toutefois à être déterminé afin de conclure sur l'implication directe de la modification du résidu 184. De même, l'expression de GSK-3 $\beta$  permet d'activer Bax P168A/60A, comme la mutation phosphomimétique S163D. La phosphorylation de la sérine 163, dans notre système d'étude, devra être caractérisée. Pour cela il est envisageable de purifier Bax par immunoprécipitation, de digérer la protéine en peptides qui seront soumis à une spectrométrie de masse afin d'identifier les résidus phosphorylés. Le marquage des protéines avec des éléments radioactifs, le  $^{32}\text{P}$  marquant les résidus phosphorylés et le  $^{35}\text{S}$  marquant les résidus soufrés est également envisagé pour déterminer le taux de phosphorylation de Bax et permettrait par ailleurs de comparer la propension de différents mutants à être phosphorylés.

L'obtention de données sur l'état de phosphorylation de Bax est un élément important à réaliser pour valider notre approche d'expression d'Akt et de GSK-3 $\beta$ .

## 6 Discussion

Les résultats présentés dans cette première partie confirment tout d'abord la relation fondamentale qui existe entre la structure de Bax et sa fonction. La sérine 184 a été identifiée par l'équipe de Richard Youle comme un résidu critique de Bax en utilisant la protéine de fusion GFP-Bax. En mutant la sérine en alanine ou en valine ils observent en microscopie de fluorescence une relocalisation constitutive de Bax vers la mitochondrie alors qu'une mutation en aspartate, glutamate ou lysine (des acides aminés chargés) abolissent la relocalisation de Bax en présence d'un stimulus apoptotique (Nechushtan *et al.*, 1999). Leur approche ne permet toutefois pas de déterminer les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la modification de l'adressage de Bax vers la mitochondrie.

L'expression de Bax dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* permet d'exprimer simplement différents mutants de Bax tout en se trouvant dans un environnement protéique dépourvu des acteurs de l'apoptose. L'expression de mutants phosphomimétiques du résidu 184 fait apparaître deux composantes essentielles de l'activation de Bax. La mutation de la sérine en alanine entraîne une localisation constitutive de Bax dans la mitochondrie cependant la protéine semble bloquée dans une conformation intermédiaire et ne subit qu'une activation limitée. À l'opposé, la mutation du résidu 184 en aspartate ne favorise pas l'adressage de Bax mais induit un changement de conformation suffisant pour que la faible quantité de Bax adressée vers la mitochondrie entraîne une libération presque totale du cytochrome c. Cette différence met en évidence que l'activation de Bax a lieu au moins en deux étapes distinctes. Tout

d'abord Bax est adressée vers la mitochondrie. Cet adressage fait intervenir la libération des extrémités de Bax. L'hélice  $\alpha 1$  est directement impliquée dans l'adressage de Bax vers la mitochondrie (Cartron *et al.*, 2003) notamment en interagissant avec le récepteur mitochondrial TOM22 (Bellot *et al.*, 2007). Le déplacement de l'ART est un élément clé de la libération de l'hélice  $\alpha 1$  (Goping *et al.*, 1998; Cartron *et al.*, 2002; Arokium *et al.*, 2004). La mobilité de l'ART est liée à celle de l'hélice  $\alpha 9$  (Kim *et al.*, 2009) et l'augmentation artificielle de la mobilité de l'hélice  $\alpha 9$  entraîne l'adressage de Bax vers la mitochondrie (Arokium *et al.*, 2004; Cartron *et al.*, 2005). Par ailleurs le mouvement de l'hélice  $\alpha 9$ , et plus généralement un changement de conformation important de la protéine, semble une étape indispensable à l'activation complète de Bax afin de permettre la libération des hélices  $\alpha 5$  et  $\alpha 6$  de Bax.

Il semble que pour le mutant S184A le changement de conformation soit bloqué dans une forme intermédiaire qui permette vraisemblablement la libération de l'hélice  $\alpha 1$  mais pas celle des domaines impliqués dans la formation du pore et entraînant la perméabilisation de la membrane externe. Le mutant S184D quant à lui semble subir un changement de conformation suffisant à la libération des domaines membranaires sans contribuer à son adressage vers la mitochondrie. Le mécanisme exact empêchant l'adressage du mutant S184D alors qu'il est parfaitement fonctionnel pour induire la libération du cytochrome c reste à déterminer.

L'expression des kinases Akt et GSK-3 $\beta$  chez la levure a apporté des informations moléculaires sur leur mode d'action sur Bax. Le rôle de GSK-3 $\beta$  observé lorsque la kinase est coexprimée avec Bax chez *Saccharomyces cerevisiae* est relativement similaire à ce qui a été décrit dans les cellules animales. Lorsque GSK-3 $\beta$  est activée Bax est phosphorylée sur la sérine 163, adressée vers la mitochondrie et déclenche la mort (Linseman *et al.*, 2004). D'une façon similaire nous avons pu mettre en évidence que GSK-3 $\beta$  favorise l'adressage de Bax vers la mitochondrie lorsque les deux protéines sont coexprimées chez la levure. Cependant la présence de GSK-3 $\beta$  n'entraîne pas l'activation de la forme native de Bax alors qu'un mutant actif (mutant P168A), inactivé et stabilisé dans une conformation fermée grâce à une seconde mutation (mutant P168A/S60A) est à la fois adressé vers la mitochondrie et activé par GSK-3 $\beta$ . De même la mutation phosphomimétique S163D ne module ni l'adressage ni l'activation complète de Bax native alors qu'elle rend le mutant P168A/S60A mitochondrial et actif. Ces résultats confirment bien le rôle activateur de GSK-3 $\beta$  sur Bax mais précisent que la kinase n'a d'effet que sur l'étape d'adressage de Bax vers la mitochondrie. La modification induite par la kinase n'est pas suffisante à activer une forme inactive de Bax et il semble que d'autres événements soient requis pour un changement de conformation complet de Bax. Il a été mis en évidence que Bax peut être mitochondriale et inactive, en attente de signaux d'activation complémentaires de ceux ayant favorisé son adressage vers la mitochondrie. L'expression de Myc dans des fibroblastes de rat sensibilise les cellules à l'apoptose induite par différentes drogues. La présence de Myc n'affecte pas la localisation mitochondriale de Bax mais est cependant nécessaire à son activation (reconnaissance par l'anticorps conformationnel 6A7), à la libération du cytochrome c et au déclenchement de l'apoptose (Soucie *et al.*, 2001). D'une façon similaire, la kinase p38MAPK semble nécessaire à l'activation de Bax lors de l'apoptose de cellules épithéliales mammaires induite par le détachement de la matrice extracellulaire. Bax est adressée très rapidement vers la mitochondrie (15 min) alors que l'apoptose n'est déclenchée qu'au bout de quelques heures. En absence de

p38MAPK Bax est bien mitochondriale mais reste incapable d'entraîner la libération du cytochrome c et de déclencher l'apoptose. (Owens *et al.*, 2009).

Des informations sur les mécanismes moléculaires impliqués dans l'interaction entre Akt et Bax ont pu être mis en évidence grâce à l'approche simplifiée que représente l'expression chez *Saccharomyces cerevisiae*. Akt peut phosphoryler Bax *in vitro* et *in vivo* et réprimer sa fonction proapoptotique, notamment en inhibant la translocation de Bax vers la mitochondrie et en favorisant son interaction avec les protéines antiapoptotiques Mcl-1 et Bcl-x<sub>L</sub> (Gardai *et al.*, 2004). Nous avons montré que le mutant phosphomimétique Bax S184D reste principalement non mitochondrial. Toutefois la mutation stimule un changement de conformation de Bax suffisant à entraîner son activation puisque la faible proportion de Bax mitochondriale suffit à entraîner une libération massive de cytochrome c. L'expression d'Akt permet également de stimuler l'activation de la forme native de Bax mais pas celle du mutant S184A indiquant que le résidu 184 est critique dans ce mécanisme. L'hypothèse pouvant être formulée sur la base de ces résultats est que la kinase Akt, ou la phosphorylation de Bax sur la sérine 184, puisse entraîner un changement de conformation de l'extrémité C-terminale de Bax. Ce changement de conformation serait caractérisé dans notre système d'étude par une libération des domaines de Bax impliqués dans la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe. Dans un contexte cellulaire animal il est très probable que Bax soit prise en charge par des partenaires inhibiteurs tels que la protéine antiapoptotique Bcl-x<sub>L</sub> avant que ces domaines soient libérés conduisant ainsi à l'inhibition de la fonction proapoptotique de Bax. La coexpression de la protéine antiapoptotique Bcl-x<sub>L</sub> dans une souche de levure exprimant le mutant actif S184D inhibe en effet la libération du cytochrome c.

Il a été montré qu'Akt et GSK-3 $\beta$  ont une localisation mitochondriale privilégiée lorsqu'elles sont activées (Bijur et Jope, 2003b,a). Nous avons observé la présence des deux kinases dans la mitochondrie lorsqu'elles sont exprimées dans la levure. De façon plus intéressante, la présence de ces kinases dans la mitochondrie semble favoriser la localisation mitochondriale de Bax dans ce compartiment. L'observation assez claire de ce fait est la comparaison entre les mutants phosphomimétiques S163D ou S184D et l'expression de la forme native de Bax et des kinases GSK-3 $\beta$  ou Akt respectivement. Tout comme la forme native de Bax ces deux mutants sont très faiblement relocalisés vers la mitochondrie. La coexpression de GSK-3 $\beta$ , bien qu'elle ne favorise pas l'activation de Bax native, induit la présence dans la fraction mitochondriale. Akt est capable d'activer Bax native, tout comme la mutation phosphomimétique S184D, mais elle entraîne également son adressage vers la mitochondrie.

L'adressage de Bax vers la mitochondrie et son activation dans une conformation capable d'entraîner la perméabilisation de la membranaire mitochondriale sont deux étapes bien distinctes. Les kinases Akt et GSK-3 $\beta$  contrôlent toutes deux ces étapes mais d'une façon distincte. Akt entraîne un changement de conformation de Bax suffisant à son activation et à la libération du cytochrome c alors que GSK-3 $\beta$  n'entraîne que son activation partielle. Il semble que d'autres facteurs interviennent dans les mécanismes tels qu'ils ont été entrevus dans les modèles cellulaires animaux. L'inactivation de Bax en présence d'Akt nécessite des partenaires pouvant interagir avec Bax une fois la protéine dans une conformation ouverte. La présence de GSK-3 $\beta$  est insuffisante pour provoquer une activation complète de Bax et d'autres facteurs semblent requis une fois Bax adressée vers la mitochondrie. Dans les deux cas, de par leur

localisation mitochondriale, les kinases pourraient participer à favoriser la localisation de Bax vers la mitochondrie, indépendamment de toute phosphorylation, en agissant comme un récepteur.



# Rôle de la protéine antiapoptotique Bcl-x<sub>L</sub> sur les changements de conformation de Bax

## Sommaire

|     |                                                                                  |     |
|-----|----------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1   | Introduction . . . . .                                                           | 111 |
| 2   | Quel est le mécanisme d'action antiapoptotique de Bcl-x <sub>L</sub> ? . . . . . | 112 |
| 2.1 | Rôle antiapoptotique de Bcl-x <sub>L</sub> . . . . .                             | 112 |
| 2.2 | Où sont localisées Bax et Bcl-x <sub>L</sub> ? . . . . .                         | 116 |
| 2.3 | Importance de la localisation mitochondriale de Bcl-x <sub>L</sub> . . . . .     | 119 |
| 2.4 | Discussion . . . . .                                                             | 123 |
| 3   | Un double rôle pour Bcl-x <sub>L</sub> ? . . . . .                               | 124 |
| 3.1 | Le rôle particulier de Bcl-x <sub>L</sub> ΔC . . . . .                           | 124 |
| 3.2 | Bad/ABT 737 . . . . .                                                            | 128 |
| 4   | Discussion . . . . .                                                             | 129 |

## 1 Introduction

Bcl-x<sub>L</sub> est un des membres antiapoptotiques de la famille Bcl-2. C'est l'isoforme protéique principale issue du gène BCL-X. Deux autres formes, Bcl-x<sub>S</sub> et Bcl-x<sub>γ</sub>, respectivement pro- et antiapoptotiques, peuvent également être produites par un épissage alternatif.

Sa fonction est essentielle puisque des souris KO pour Bcl-x<sub>L</sub> ne terminent pas leur développement embryonnaire. Très proche de celle de Bcl-2, la fonction de Bcl-x<sub>L</sub> n'est toutefois pas parfaitement équivalente. Bien qu'en partie cytosolique, Bcl-x<sub>L</sub> possède des particularités structurales, notamment dans la partie C-terminale, lui assurant une localisation membranaire essentiellement mitochondriale (Kaufmann *et al.*, 2003) alors que Bcl-2 est présente dans la membrane de compartiments plus divers.

Structuralement, Bcl-x<sub>L</sub> est également très proche de Bax. Elle est légèrement plus grosse avec une taille de 26 kDa pour 233 acides aminés. La forme cristallisée de Bcl-x<sub>L</sub> (dépourvue de son hélice C-terminale) révèle une organisation en 7 hélices alpha (Muchmore *et al.*, 1996). Tout comme pour Bax

les hélices  $\alpha$ 5-6 forment une structure en épingle à cheveux homologue de celle des toxines diphtériques. Ces hélices  $\alpha$ 5-6 peuvent s'insérer dans des membranes lipidiques *in vitro* et former des pores (Minn *et al.*, 1997).

Bcl-x<sub>L</sub> interagit avec Bax *via* son sillon hydrophobe (BH1-2) et le domaine BH3 de Bax (Sedlak *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1998) et empêche sa fonction proapoptotique. L'interaction entre Bax et Bcl-x<sub>L</sub> peut être déplacée par des protéines proapoptotiques à BH3-seulement telles que Bad (Yang *et al.*, 1995). La localisation mitochondriale de Bcl-x<sub>L</sub> en fait *a priori* un partenaire privilégié de Bax. Cette hypothèse est soutenue par le fait que la fraction cytosolique de Bcl-x<sub>L</sub> soit adressée, conjointement à Bax, vers la mitochondrie lors du déclenchement de l'apoptose (Hsu *et al.*, 1997b).

En 2004, le rôle de la protéine kinase Akt sur l'adressage de Bax est mis en évidence et montre que lorsque la kinase est activée elle phosphoryle Bax et inhibe son adressage vers la mitochondrie. En parallèle une interaction accrue entre Bax et les protéines antiapoptotiques Bcl-x<sub>L</sub>, Mcl-1 et A1 est observée (Gardai *et al.*, 2004). Les auteurs proposent que Bcl-x<sub>L</sub> puisse séquestrer Bax hors du compartiment mitochondrial et empêcher son adressage.

Dans cette partie nous nous sommes intéressés aux mécanismes d'action de Bcl-x<sub>L</sub> sur Bax. Nous avons tenté de caractériser le rôle direct de Bcl-x<sub>L</sub> sur Bax dans notre système d'étude simplifié chez *Saccharomyces cerevisiae* afin de nous affranchir de l'intervention de partenaires de Bax autre que Bcl-x<sub>L</sub>. Nous avons plus particulièrement cherché à déterminer à quelle étape de l'activation de Bax intervenait Bcl-x<sub>L</sub>.

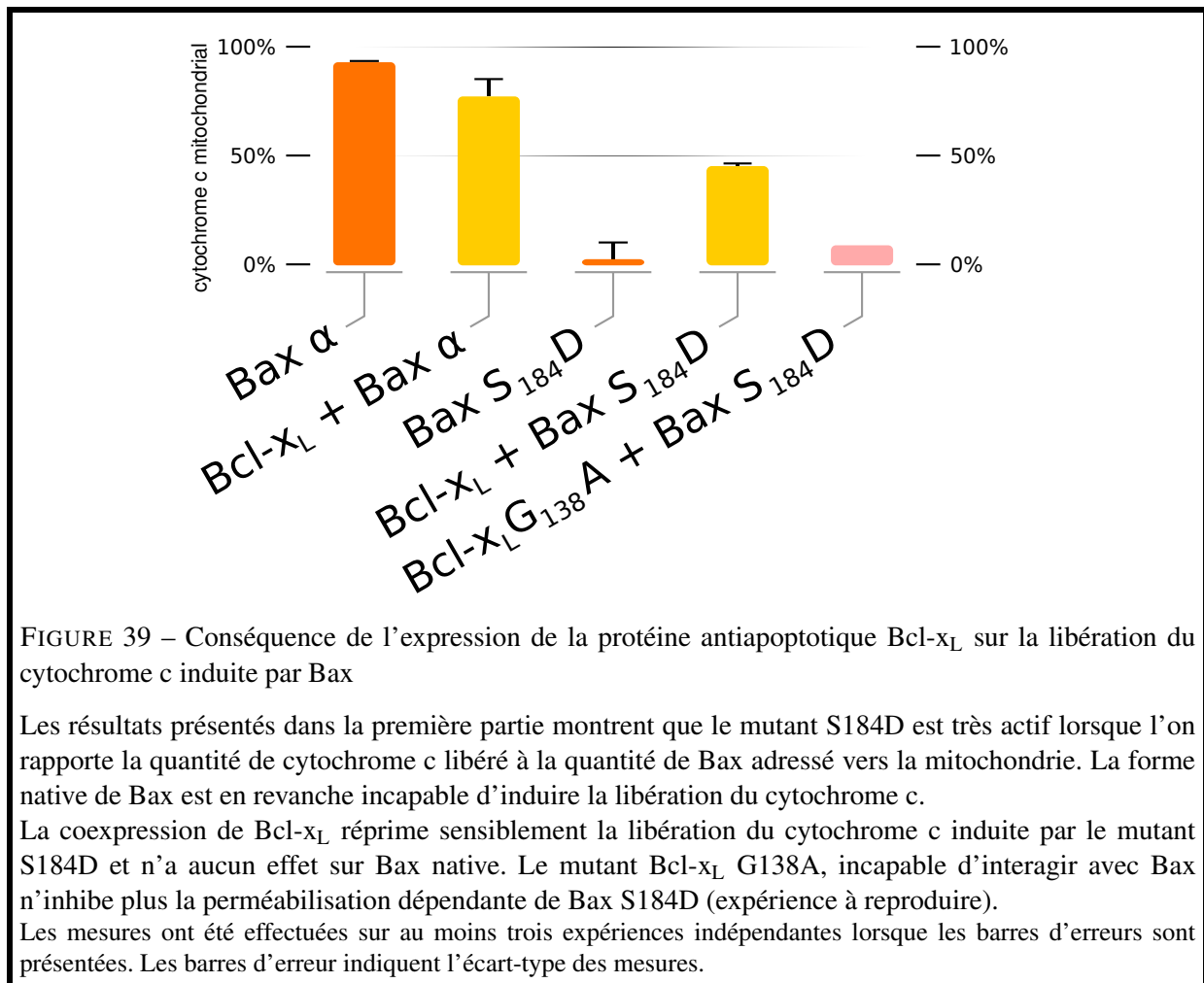
## 2 Quel est le mécanisme d'action antiapoptotique de Bcl-x<sub>L</sub> ?

### 2.1 Rôle antiapoptotique de Bcl-x<sub>L</sub>

Nous avons tout d'abord caractérisé le rôle de la forme native de Bcl-x<sub>L</sub> sur un mutant actif de Bax. Le mutant S184D, présenté dans la première partie, mime la phosphorylation de la sérine 184. Il possède une forte capacité de perméabilisation de la mitochondrie en dépit d'un faible adressage. Par ailleurs il mime les conditions dans lesquelles Gardai *et al.* (2004) rapportent une plus forte interaction avec Bcl-x<sub>L</sub> que la forme native de Bax. À l'inverse le mutant S184A est mitochondrial bien que peu actif. Nous avons donc étudié le rôle antiapoptotique de Bcl-x<sub>L</sub> dans notre système d'étude en coexprimant la protéine Bcl-x<sub>L</sub> et différents variants de Bax chez *Saccharomyces cerevisiae* puis en quantifiant les cytochromes sur mitochondries isolées qui rapportent la perméabilisation mitochondriale induite par Bax en présence de Bcl-x<sub>L</sub> (Figure 39).

Le mutant S184D exprimé seul entraîne une libération quasi-totale du cytochrome c. La coexpression de la protéine antiapoptotique Bcl-x<sub>L</sub> protège partiellement les mitochondries et réduit de moitié la libération du cytochrome c. Aucune différence significative de la libération du cytochrome c n'est observée quand Bcl-x<sub>L</sub> est co-exprimée avec la forme native et inactive de Bax, ou le mutant S184A peu actif.

La mutation de la glycine 138 de Bcl-x<sub>L</sub> en alanine est connue pour empêcher l'interaction avec Bax. Le résidu 138 est localisé dans le domaine BH1, au niveau du sillon hydrophobe de Bcl-x<sub>L</sub>, une zone impliquée dans l'interaction avec le domaine BH3 de Bax (Sedlak *et al.*, 1995). La mutation G138A



abolit effectivement l'effet protecteur de Bcl-x<sub>L</sub> observé sur le mutant S184D de Bax et suggère que l'inhibition de Bax par Bcl-x<sub>L</sub> est directe et dépend de l'interaction entre les deux protéines.

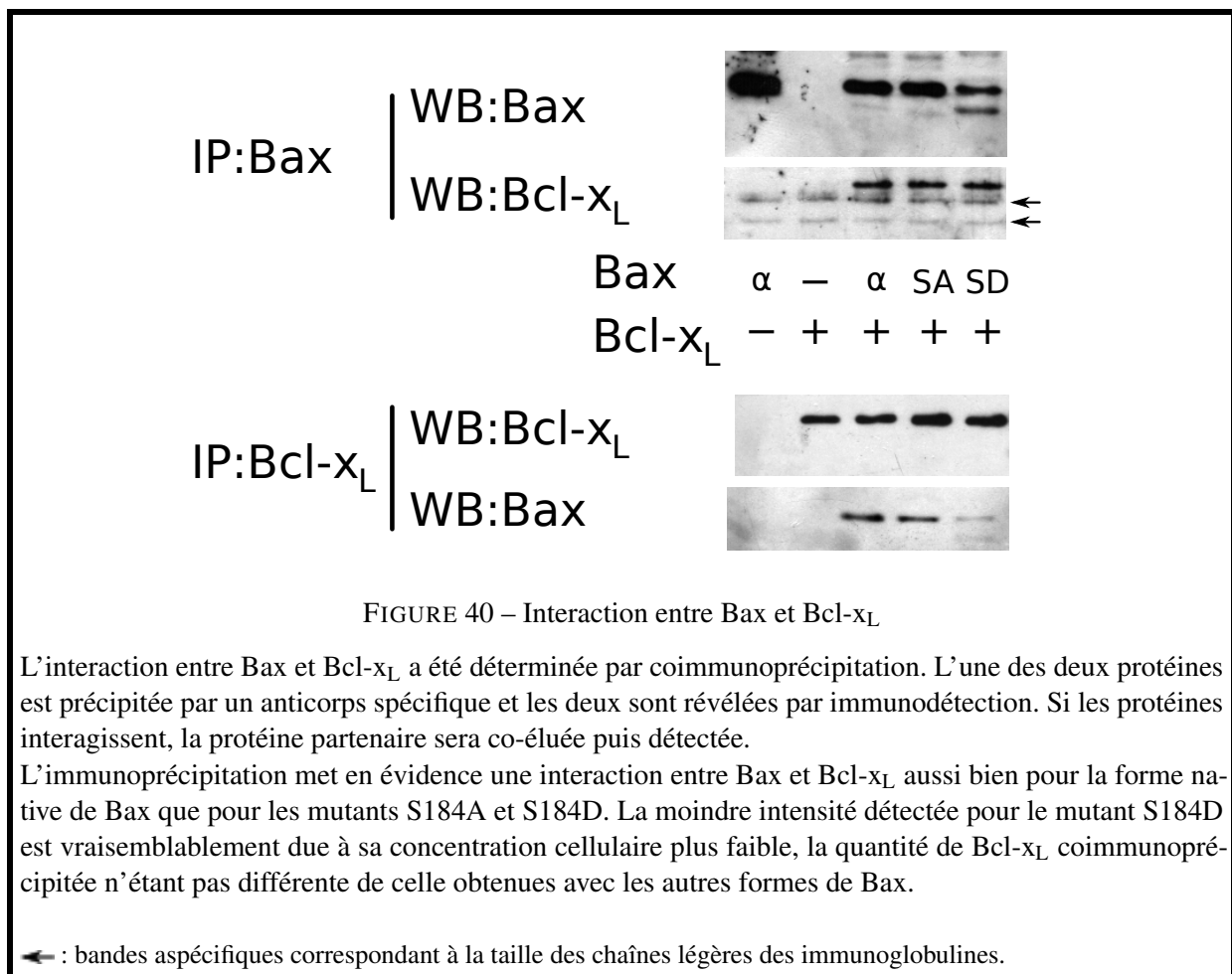
Le rôle antiapoptotique de Bcl-x<sub>L</sub> semblant être dépendant de l'interaction avec Bax, une co-immunoprécipitation a été réalisée afin de déterminer si les variants de Bax utilisés interagissent avec Bcl-x<sub>L</sub>. Bax (ou Bcl-x<sub>L</sub>) a été immunoprécipitée afin de purifier la protéine. L'éluat obtenu a été ensuite séparé par SDS-PAGE puis transféré sur membrane. Enfin les protéines immunoprécipitées ont été détectées soit par un anticorps anti-Bax, soit par un anticorps anti-Bcl-x<sub>L</sub>. Dans le cas où les deux protéines interagissent, la protéine partenaire est purifiée conjointement par l'immunoprécipitation et est donc détectée sur la membrane (Figure 40).

Pour les trois variants de Bax (Bax native, Bax S184A et Bax S184D) une interaction avec Bcl-x<sub>L</sub> a été mise en évidence par co-immunoprécipitation. Aucune différence significative d'interaction avec Bcl-x<sub>L</sub> n'est observée entre Bax native et le mutant S184A.

Le mutant S184D est détecté dans de plus faibles proportions, aussi bien en immunoprécipitant Bax que Bcl-x<sub>L</sub>. Bax native et le mutant S184A sont présentes dans des proportions similaires. Le fait que le mutant S184D soit immunoprécipité en quantités plus faibles peut être expliqué par plusieurs hypothèses. Il est possible que la quantité de Bax S184D immunoprécipitée puisse refléter sa concentration cellulaire,

qui est initialement plus faible pour Bax S184D que pour Bax native ou S184A. La proportion de Bcl-x<sub>L</sub> co-immunoprécipitée similaire pour Bax native, S184A et S184D suggère que Bax soit en excès. Dans ces conditions, la plus faible quantité de Bax co-immunoprécipitée avec Bcl-x<sub>L</sub> indiquerait que l'interaction entre Bcl-x<sub>L</sub> et Bax S184D se fait avec moins d'affinité qu'avec Bax native et Bax S184A. Il faudra faire varier les concentrations de Bax et Bcl-x<sub>L</sub> afin de pouvoir avoir une meilleure approximation de la constante de dissociation.

Les conclusions pouvant être tirées de cette observation sont que Bax native et S184A semblent interagir de manière similaire avec Bcl-x<sub>L</sub> et que l'interaction entre le mutant S184D et Bcl-x<sub>L</sub> pourrait être plus faible. Toutefois, en l'absence d'un niveau d'expression identique du mutant S184D il est impossible d'affirmer que l'interaction avec Bcl-x<sub>L</sub> est réellement différente et l'utilisation d'une méthode quantitative sera nécessaire pour lever ce doute.



Une des hypothèses permettant d'expliquer le mode d'action de la kinase Akt sur Bax suggérerait qu'une fois phosphorylée Bax ait une affinité accrue pour ses partenaires antiapoptotiques Bcl-x<sub>L</sub> et Mcl-1 (Gardai *et al.*, 2004)

Bcl-x<sub>L</sub> a une localisation mitochondriale grâce à son hélice α hydrophobe C-terminale. Il faudra étudier si l'interaction entre Bax et Bcl-x<sub>L</sub> est différente dans le compartiment mitochondrial et dans le

cytosol. Il est en effet possible que l'environnement des protéines puisse changer leur affinité et participer et moduler la régulation de Bax par Bcl-x<sub>L</sub>.

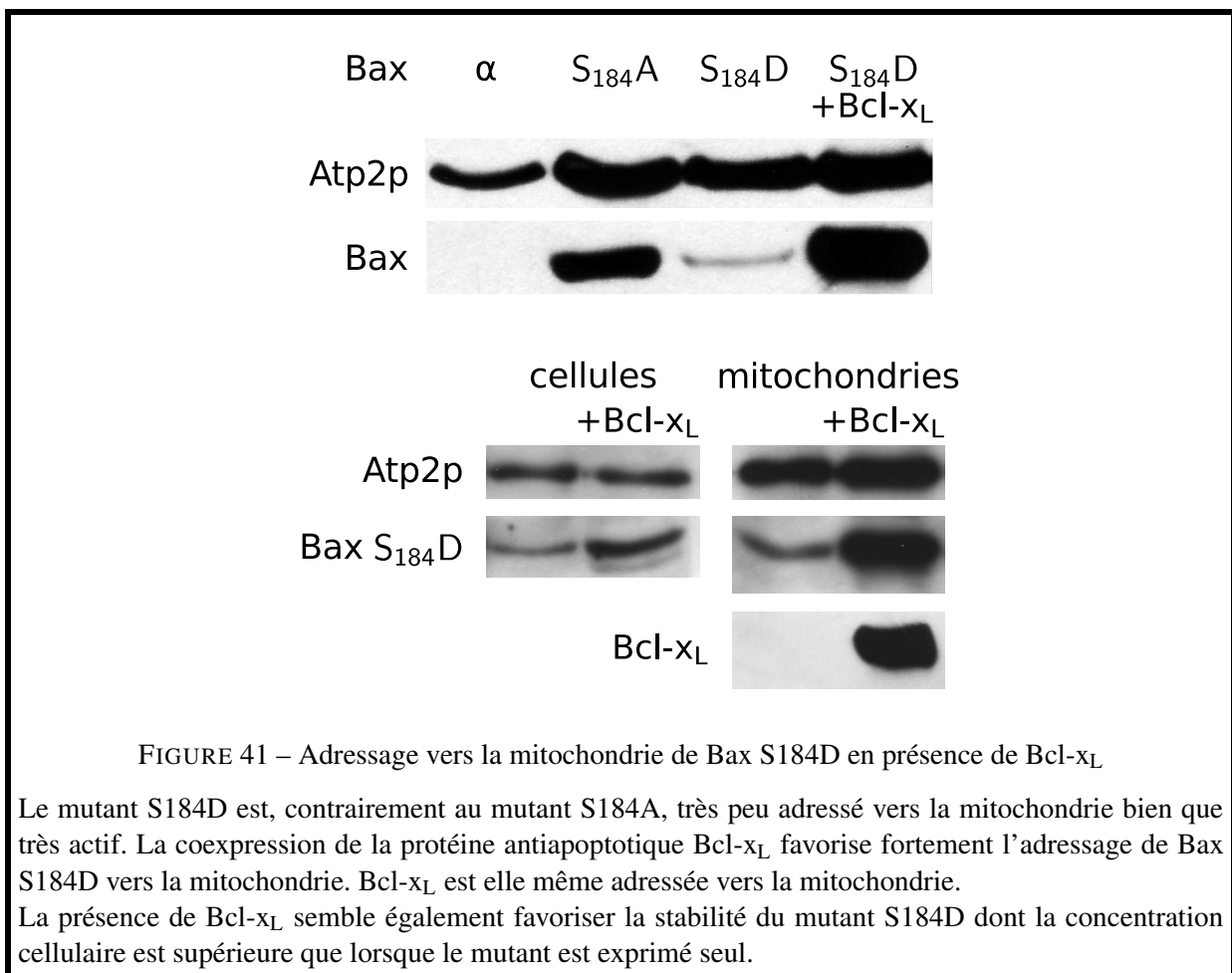
Ces premières observations apportent des éléments de réponse quant aux mécanismes impliqués dans l'inhibition de Bax par Bcl-x<sub>L</sub>. L'interaction entre les protéines est nécessaire dans notre système d'étude pour que Bcl-x<sub>L</sub> ait un effet anti-apoptotique. Cette interaction implique d'une façon tout à fait classique le sillon hydrophobe de Bcl-x<sub>L</sub> puisqu'une mutation dans cette partie de Bcl-x<sub>L</sub> abolit son effet protecteur (la mutation G138A est située dans le domaine BH1 de la Bcl-x<sub>L</sub>).

Pour tous les variants de Bax étudiés une interaction avec Bcl-x<sub>L</sub> a pu être mise en évidence. Aucune différence majeure d'interaction n'a été détectée entre Bcl-x<sub>L</sub> et Bax native ou Bax S184A. Bax S184D pourrait en revanche avoir une affinité plus faible pour Bcl-x<sub>L</sub>, cependant la méthode utilisée (co-immunoprécipitation) n'est pas quantitative du fait de la différence des quantités de Bax immunoprécipitées. La détermination de l'affinité entre les protéines par des approches quantitatives permettrait de conclure sur l'importance du résidu 184 et plus généralement sur l'importance de la conformation de Bax dans une éventuelle modulation de cette interaction. Il est par exemple possible d'utiliser une approche par résonance plasmonique de surface. Pour cela les protéines dont l'interaction est à caractériser doivent être purifiées et l'une d'elle est fixée sur une fine couche métallique. La présence d'un ligand de la protéine fixée modifie l'oscillation des ondes plasmon à la surface de la couche métallique qui peut être détectée par la mesure de l'angle de diffraction d'un rayon lumineux sur la couche métallique. Cette méthode *in vitro* permet d'obtenir assez facilement des constantes d'affinité entre les protéines étudiées mais nécessite au préalable de les purifier. Afin de conserver les conditions physiologiques d'interaction entre Bax et Bcl-x<sub>L</sub>, il serait également envisageable d'essayer de garder les protéines dans un environnement membranaire pour réaliser la mesure de leur affinité.

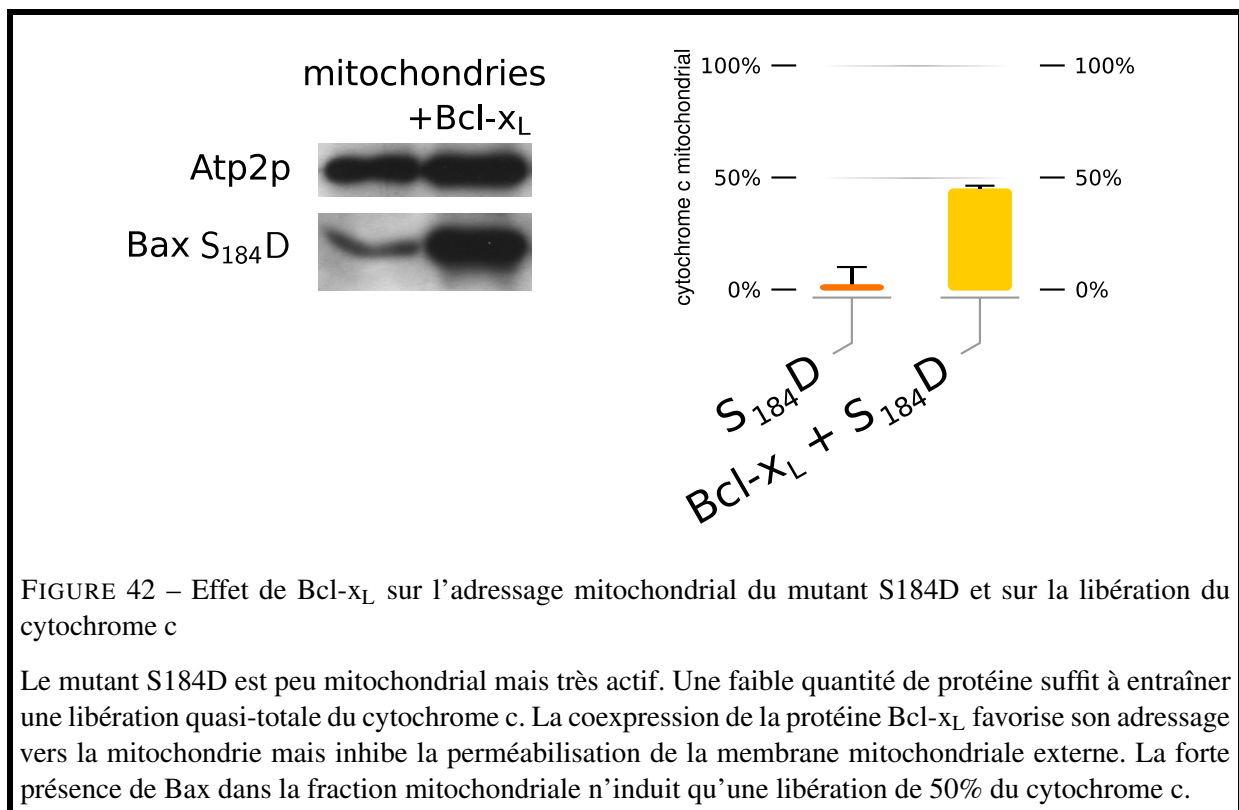
## 2.2 Où sont localisées Bax et Bcl-x<sub>L</sub> ?

Bcl-x<sub>L</sub> réprime le caractère proapoptotique du mutant Bax S184D et réduit environ de moitié la libération du cytochrome c. Cette inhibition est dépendante de l'interaction entre Bax et Bcl-x<sub>L</sub>. Une des hypothèses expliquant le rôle antiapoptotique de Bcl-x<sub>L</sub> suppose que la protéine puisse séquestrer Bax hors de la mitochondrie et ainsi empêcher la perméabilisation de la membrane externe. Nous avons caractérisé l'adressage et l'insertion de Bax sur mitochondries isolées en présence de Bcl-x<sub>L</sub> (Figure 41). Aussi bien la forme native de Bax que le mutant S184D, très peu adressés en l'absence de Bcl-x<sub>L</sub>, deviennent fortement mitochondriaux lorsque la protéine antiapoptotique est coexprimée.

La quantité cellulaire globale de Bax est elle-même augmentée en présence de Bcl-x<sub>L</sub>. Il a été présenté dans la partie précédente que le mutant S184D est présent en moindres quantités lorsqu'il est exprimé seul. Ce fait est vraisemblablement dû à une instabilité de Bax S184D dont la conformation doit être en partie ouverte puisque le mutant est fortement actif mais peu mitochondrial. À l'inverse un mutant actif et mitochondrial est stabilisé par son interaction avec la membrane. La coexpression de Bcl-x<sub>L</sub> avec Bax pourrait donc induire une stabilisation du mutant *via* leur interaction et expliquer cette augmentation de la quantité cellulaire de Bax S184D en présence de Bcl-x<sub>L</sub>.

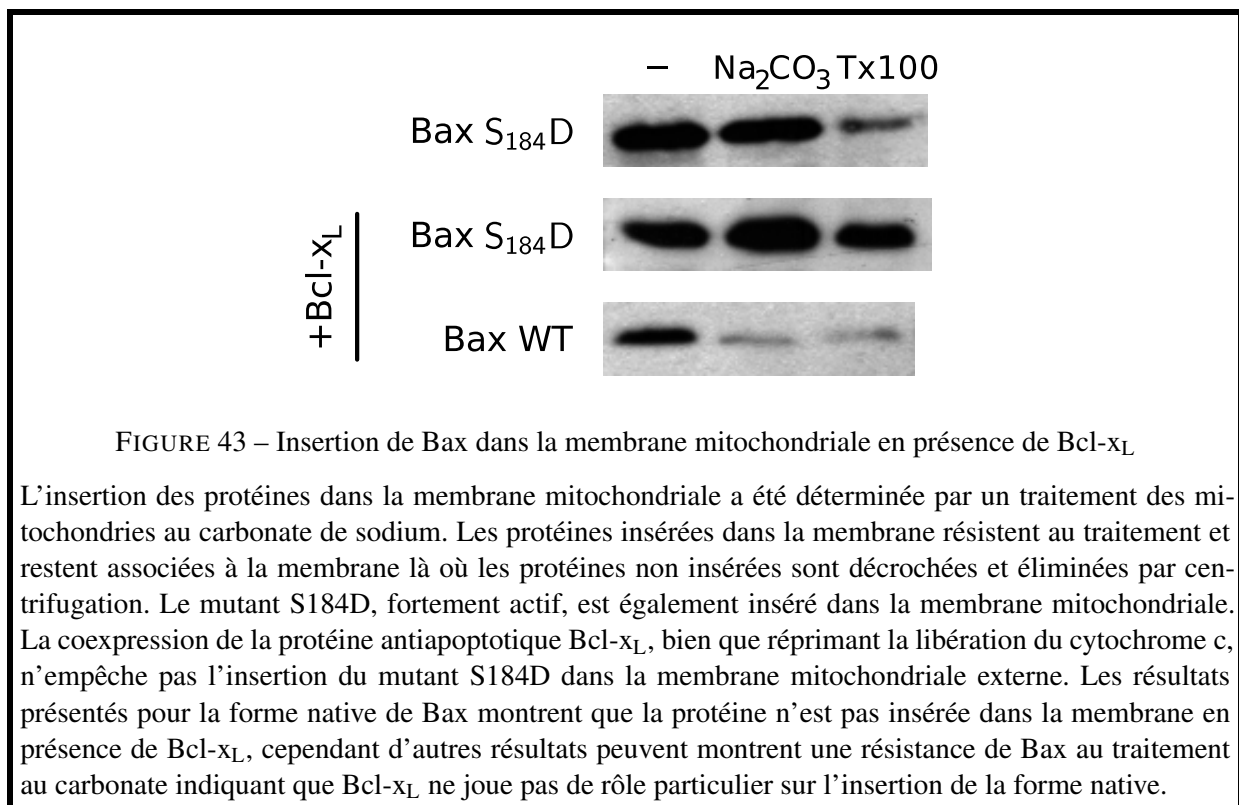


En accord avec sa localisation mitochondriale, nous avons confirmé que le rôle antiapoptotique de Bcl-x<sub>L</sub> n'est pas dû à une inhibition de l'adressage de Bax. La présence de Bcl-x<sub>L</sub> n'inhibe pas, et favorise même dans notre modèle d'étude, l'adressage vers la mitochondrie de variants initialement non mitochondriaux de Bax. Cette augmentation de la localisation mitochondriale de Bax en présence de Bcl-x<sub>L</sub> ne remet cependant pas en cause la fonction antiapoptotique de Bcl-x<sub>L</sub> dans notre système d'étude puisque la perméabilisation induite par le mutant S184D, très actif en absence de Bcl-x<sub>L</sub>, est inhibée de moitié lorsque Bcl-x<sub>L</sub> est coexprimée. La forte présence de Bax S184D dans la fraction mitochondriale lorsque Bcl-x<sub>L</sub> est coexprimée pourrait par ailleurs expliquer le fait que l'inhibition résultant de la présence de Bcl-x<sub>L</sub> ne soit pas totale. De même que décrit pour le mutant S184A dans la partie précédente, il est probable que la perméabilisation observée dans ces conditions soit due plutôt à la quantité importante de Bax adressée vers la mitochondrie qu'à la capacité de Bax à perméabiliser la membrane mitochondriale. Le fait de rapporter la quantité de cytochrome c libérée à la quantité de Bax présente dans la fraction mitochondriale indique clairement que la capacité intrinsèque de Bax S184D à entraîner la libération du cytochrome c est pratiquement abolie en présence de Bcl-x<sub>L</sub> (Figure 42).



Afin de poursuivre la compréhension du mécanisme de contrôle de Bax par Bcl-x<sub>L</sub>, nous avons déterminé la capacité de Bax à s'insérer dans la membrane interne en présence de Bcl-x<sub>L</sub> en traitant au carbonate de sodium les mitochondries isolées. Cette expérience permet de déterminer si Bcl-x<sub>L</sub> empêche l'insertion de Bax dans la membrane. Dans le cas où Bcl-x<sub>L</sub> empêcherait l'insertion de Bax, celle-ci devrait être décrochée de la fraction mitochondriale par le traitement (Figure 43).

Le traitement au carbonate de sodium ne décroche pas Bax S184D de la membrane mitochondriale en présence de Bcl-x<sub>L</sub>. Le mutant S184D est donc bien membranaire et Bcl-x<sub>L</sub> n'empêche pas son insertion dans la membrane.



Alors que les résultats obtenus avec le mutant S184D montrent systématiquement une insertion de Bax en présence de Bcl-x<sub>L</sub>, ceux concernant la forme native de Bax sont plus variables. Dans certains cas la forme native résiste au traitement au carbonate autant que les mutants. Cette variabilité pourrait dépendre de nombreux facteurs parfois non maîtrisés comme l'état physiologique des levures. La croissance des levures lorsque Bax est exprimée et en effet difficile à contrôler. Il arrive que toutes les souches ne croissent pas à la même vitesse et que des levures atteignent plus rapidement la phase stationnaire. D'une façon générale certains variants de Bax présentent un comportement plus fluctuant que d'autres. Le mutant S184A induit une perméabilisation pouvant varier d'une libération du cytochrome c assez limitée (moins de 20%) à plus de 50% de cytochrome c libéré. De même la forme native de Bax est parfois légèrement mitochondriale. Ces observations pourraient traduire la susceptibilité de la forme native de Bax à changer de conformation là où certains mutants sont bloqués dans une des conformations possibles de Bax. Enfin, le fait qu'en présence de Bcl-x<sub>L</sub> le mutant S184D soit inséré dans la membrane

mitochondriale suggère que Bcl-x<sub>L</sub> n'exerce pas de contrôle direct sur la capacité de Bax à s'insérer dans la membrane mitochondriale. Cette hypothèse est étayée par le fait que Bax native puisse être insérée dans la membrane en présence de Bcl-x<sub>L</sub>. Il est probable que la variabilité de l'insertion de Bax native dans la membrane reflète des propriétés intrinsèques de Bax et soit indépendante de Bcl-x<sub>L</sub>. En effet, la présence de Bax native dans la membrane n'est pas systématiquement abolie en présence de Bcl-x<sub>L</sub>.

### 2.3 Importance de la localisation mitochondriale de Bcl-x<sub>L</sub>

Afin de déterminer si la localisation mitochondriale de Bcl-x<sub>L</sub> joue un rôle dans sa capacité d'inhibition de Bax nous avons cherché à obtenir une forme non mitochondriale de Bcl-x<sub>L</sub>. Nous avons tout d'abord utilisé une forme de Bcl-x<sub>L</sub> dépourvue de son hélice C-terminale (Bcl-x<sub>L</sub>ΔC) dans le but d'empêcher sa localisation mitochondriale et son insertion dans la membrane externe. Nous avons cependant observé un comportement non attendu de cette forme de Bcl-x<sub>L</sub> qui reste partiellement adressée à la mitochondrie (Figure 44) et provoque une légère libération du cytochrome c (Figure 47). Le fait que la suppression de l'hélice C-terminale altère profondément le comportement de protéines de la famille Bcl-2 a déjà été rapporté. BaxΔC est mitochondriale et active et la fonction antiapoptotique de Bcl-x<sub>L</sub>ΔC est altérée (Priault *et al.*, 1999; Tremblais *et al.*, 1999).

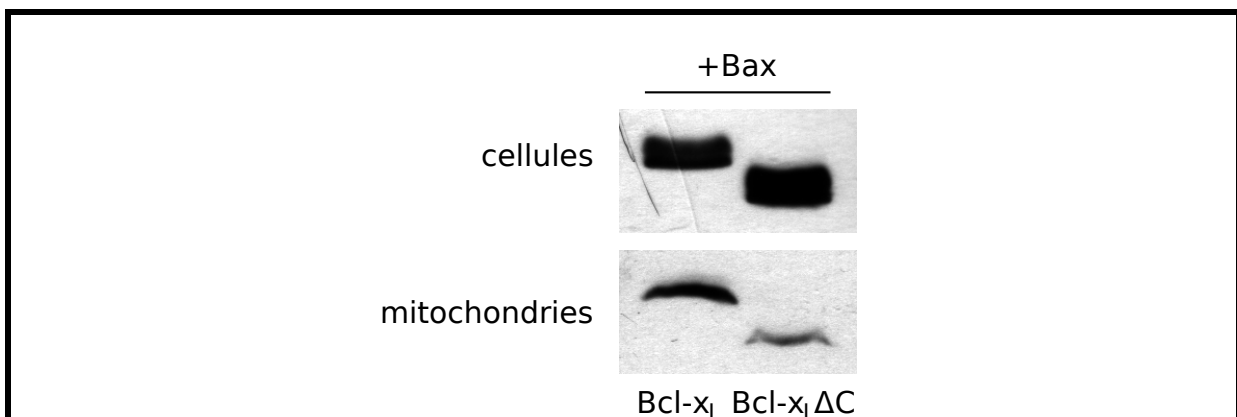


FIGURE 44 – Adressage vers la mitochondrie de Bcl-x<sub>L</sub> et Bcl-x<sub>L</sub>ΔC

Bcl-x<sub>L</sub> et Bcl-x<sub>L</sub>ΔC ont été coexprimées avec Bax. L'adressage de Bcl-x<sub>L</sub> et de Bcl-x<sub>L</sub>ΔC a été déterminé par western-blot sur une fraction mitochondriale. En témoin, la quantité cellulaire des protéines a été évaluée sur extraits totaux.

Nous avons remarqué que Bcl-x<sub>L</sub>ΔC est systématiquement présente en quantité plus importante dans les cellules que Bcl-x<sub>L</sub>.

Les deux variants sont adressés vers la mitochondrie. Toutefois Bcl-x<sub>L</sub> est plus mitochondriale que Bcl-x<sub>L</sub>ΔC autant en quantité absolue de protéines dans la fraction mitochondriale qu'en proportion ramenée à la quantité totale de Bcl-x<sub>L</sub> dans la cellule.

Deux mutants du segment transmembranaire de Bcl-x<sub>L</sub> ont été construits, les mutants G217R et A221R apportant un résidu chargé positivement au tiers ou aux deux-tiers du segment transmembranaire. La position de la mutation dans l'hélice peut être critique sur l'effet qu'elle induira. Les membranes biologiques telles que la membrane mitochondriale externe sont composées d'une bicouche lipidique

définissant plusieurs zones. Les extrémités de la bicouche sont hydrophiles, ainsi la présence de résidus chargés à ce niveau peut favoriser l'ancrage d'un segment transmembranaire. C'est le cas pour Bcl-x<sub>L</sub> qui possède des résidus chargés positivement (arginines et lysines) de part et d'autre du segment transmembranaire. La partie centrale de la bicouche lipidique est hydrophobe avec un maximum au centre des chaînes des acides gras qui la composent. Le choix de muter des résidus potentiellement situés dans cette zone devrait favoriser l'effet répulsif (charge et encombrement stérique) engendré par l'ajout de la charge positive.

Les deux variants de Bcl-x<sub>L</sub> sont exprimés de façon similaire, la distribution du mutant G217R est à la fois cytosolique et mitochondriale alors que la mutation A221R abolit la présence de Bcl-x<sub>L</sub> dans la fraction mitochondriale (Figure 45).

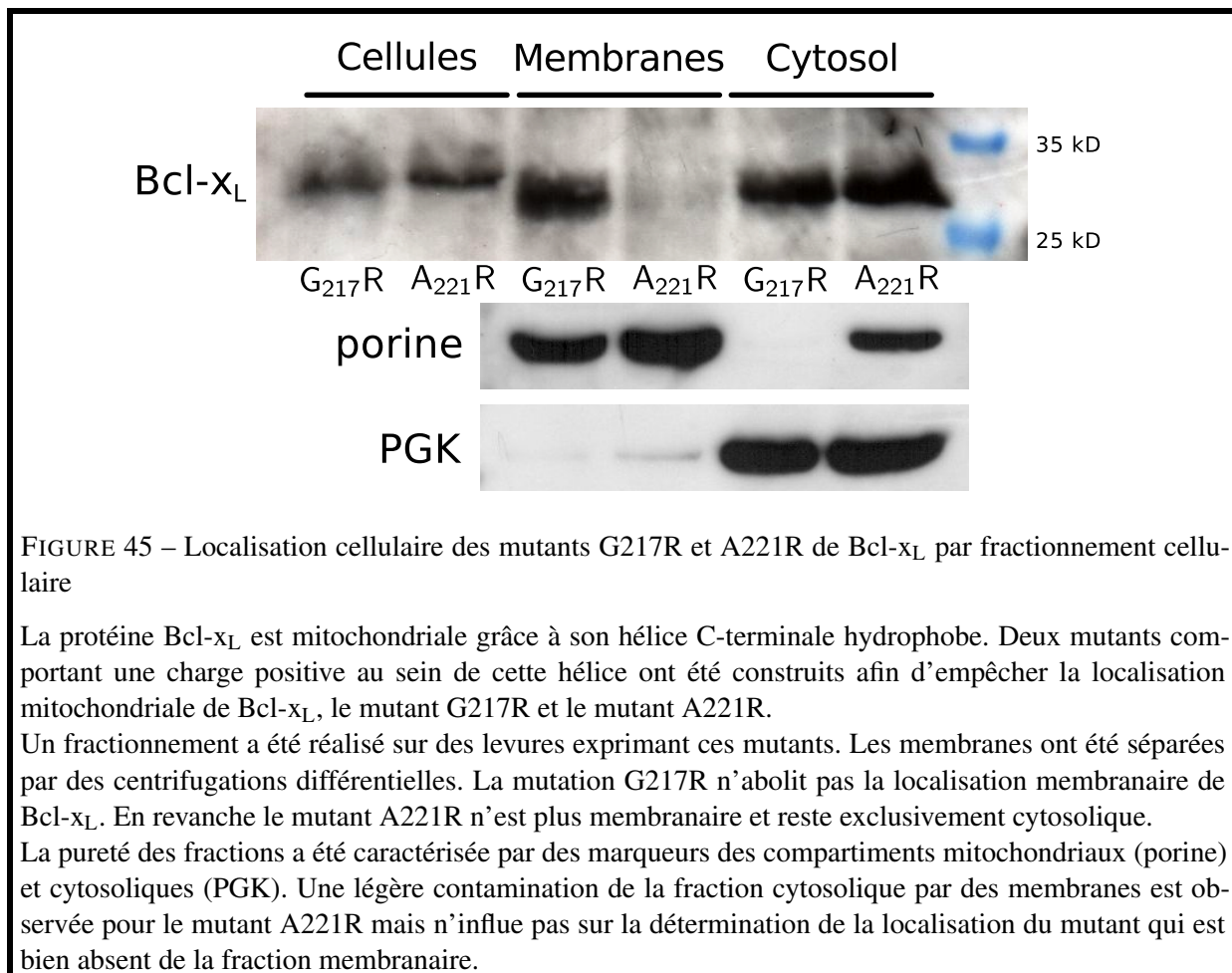


FIGURE 45 – Localisation cellulaire des mutants G217R et A221R de Bcl-x<sub>L</sub> par fractionnement cellulaire

La protéine Bcl-x<sub>L</sub> est mitochondriale grâce à son hélice C-terminale hydrophobe. Deux mutants comportant une charge positive au sein de cette hélice ont été construits afin d'empêcher la localisation mitochondriale de Bcl-x<sub>L</sub>, le mutant G217R et le mutant A221R.

Un fractionnement a été réalisé sur des levures exprimant ces mutants. Les membranes ont été séparées par des centrifugations différentielles. La mutation G217R n'abolit pas la localisation membranaire de Bcl-x<sub>L</sub>. En revanche le mutant A221R n'est plus membranaire et reste exclusivement cytosolique.

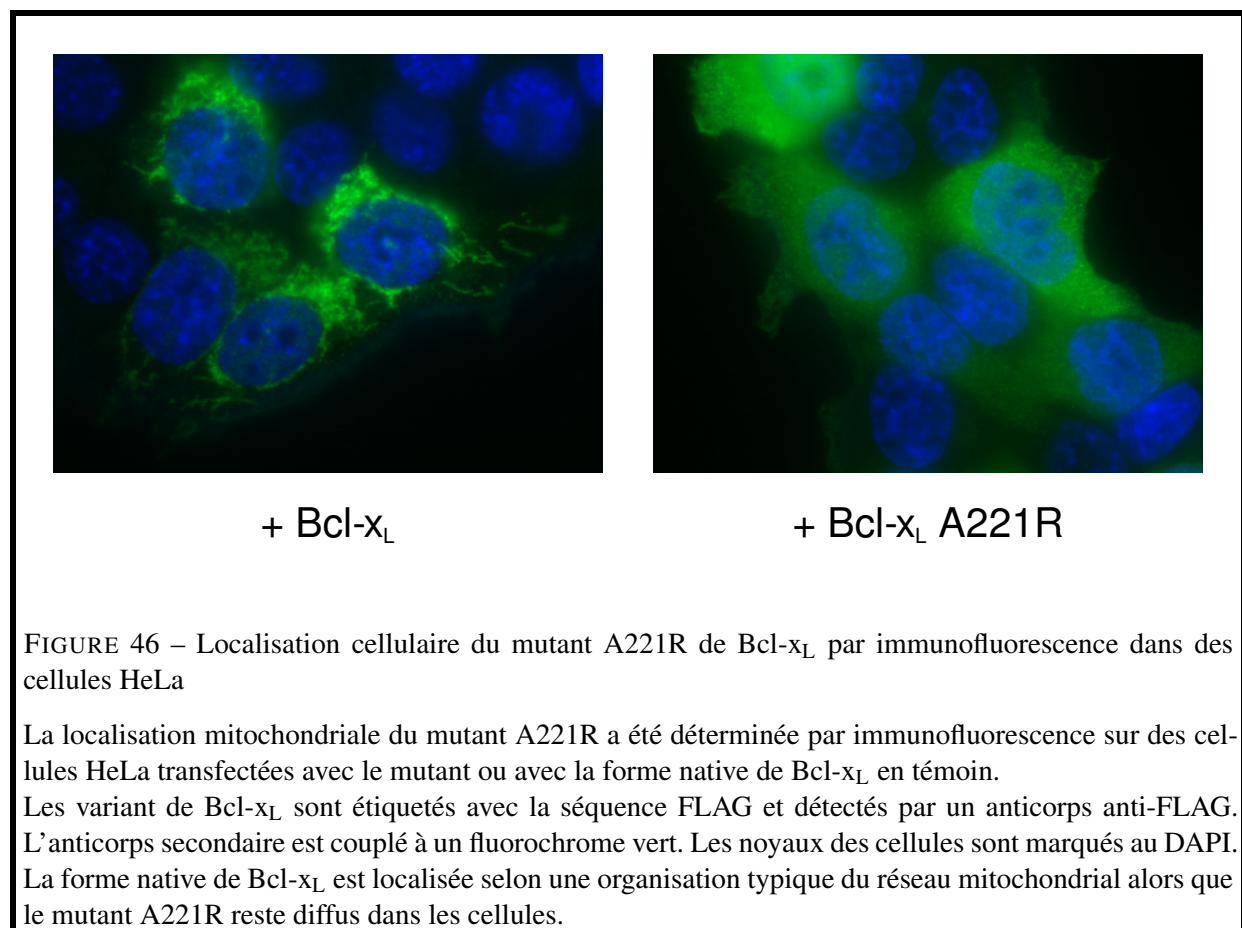
La pureté des fractions a été caractérisée par des marqueurs des compartiments mitochondriaux (porine) et cytosoliques (PGK). Une légère contamination de la fraction cytosolique par des membranes est observée pour le mutant A221R mais n'influe pas sur la détermination de la localisation du mutant qui est bien absent de la fraction membranaire.

Afin de confirmer les résultats obtenus dans la levure sur la localisation du mutant A221R de Bcl-x<sub>L</sub>, nous avons exprimé cette protéine mutante dans des cellules humaines en culture de la lignée HCT116 (cellules cancéreuses de colon). Dans le même temps, afin de ne pas détecter la protéine Bcl-x<sub>L</sub> endogène ni influencer la localisation du mutant, les cellules ont été infectées par un lentivirus permettant l'expression d'un ARN interférent dirigé spécifiquement vers la forme endogène de Bcl-x<sub>L</sub>. Les ARN interférents

en se fixant sur les ARN messagers correspondant à Bcl-x<sub>L</sub> endogène, promeuvent leur dégradation et donc l'absence de traduction.

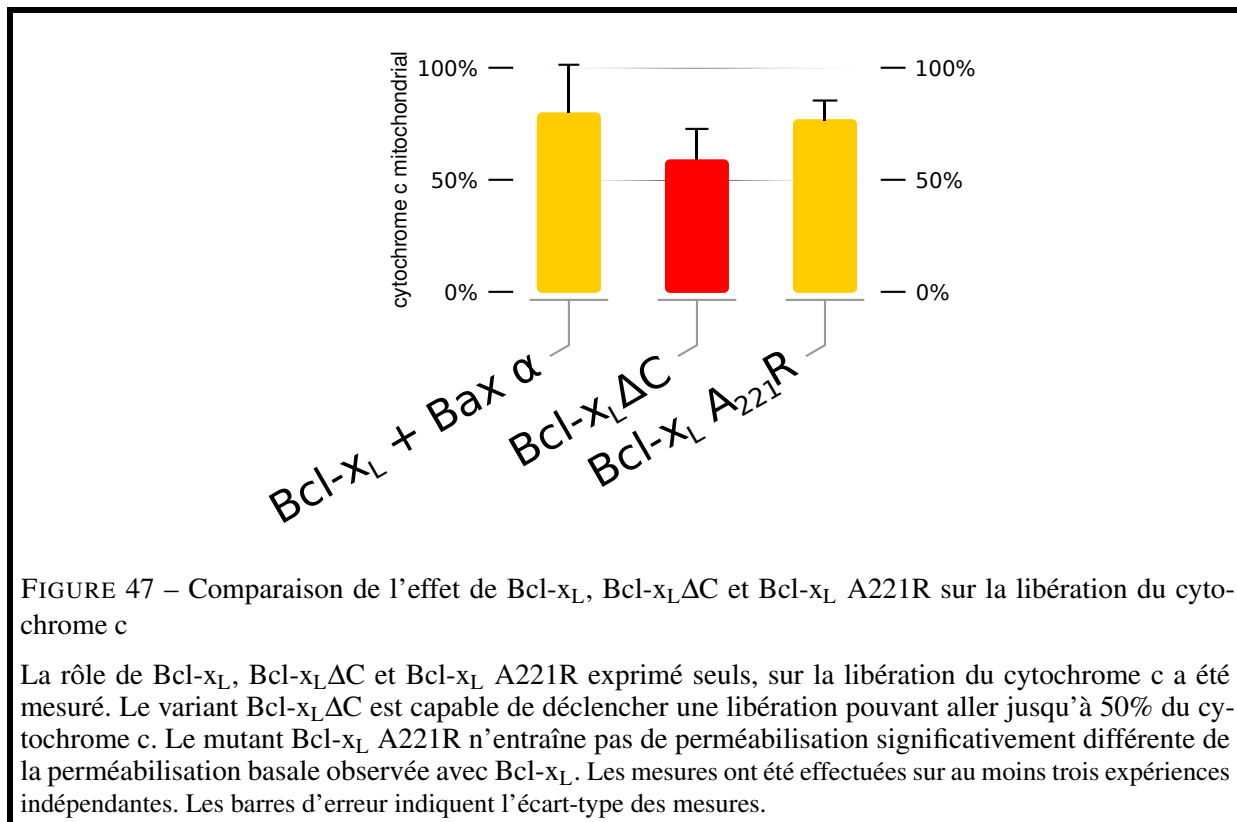
Le mutant A221R de Bcl-x<sub>L</sub> a ensuite été détecté par immunolocalisation couplée à de la microscopie de fluorescence. Des cellules exprimant le mutant ou la forme native de Bcl-x<sub>L</sub> ont été fixées sur lamelles de verre, perméabilisées et incubées en présence d'un anticorps dirigé contre Bcl-x<sub>L</sub>. En parallèle la même expérience a été réalisée avec une forme de Bcl-x<sub>L</sub> fusionnées à une étiquette FLAG. L'intérêt d'utiliser la séquence FLAG pour l'immunofluorescence est qu'elle est très immunogénique en raison de sa séquence en acides aminés particulière (DYKDDDDK). Elle est généralement bien mieux reconnue par des anticorps spécifiques que des épitopes aléatoires des protéines.

Les résultats obtenus par microscopie indiquent que contrairement à la forme native et mitochondriale de Bcl-x<sub>L</sub>, le mutant A221R n'est plus localisé dans le compartiment mitochondrial mais reste cytosolique comme en témoigne la localisation diffuse au sein des cellules (Figures 46). La mutation empêche effectivement la relocalisation de Bcl-x<sub>L</sub> vers la mitochondrie.



La mutation A221R de la protéine antiapoptotique Bcl-x<sub>L</sub> est une alternative beaucoup plus physiologique pour obtenir un variant non mitochondrial que la suppression complète de l'hélice C-terminale. La mutation abolit la localisation mitochondriale (et plus généralement membranaire) de Bcl-x<sub>L</sub> et ne semble pas perturber sa conformation. Contrairement à Bcl-x<sub>L</sub>ΔC, qui induit une altération de la membrane mito-

chondriale, Bcl-x<sub>L</sub> A221R induit une libération du cytochrome c comparable à la forme native de Bcl-x<sub>L</sub> (et à celle d'un variant inactif de Bax) (Figure 47).



Le mutant A221R a ensuite été utilisé dans la levure comme variant non mitochondrial de Bcl-x<sub>L</sub>. À l'heure actuelle l'expression de Bcl-x<sub>L</sub> A221R dans la levure a été rendue difficile en raison du faible niveau d'expression, à la fois de Bcl-x<sub>L</sub>, mais aussi des variants de Bax coexprimés. Ainsi il a été impossible, pour le moment, de déterminer l'adressage de Bax vers la mitochondrie. Les résultats obtenus concernant la capacité de Bax d'induire la libération du cytochrome c en présence du mutant A221R de Bcl-x<sub>L</sub> semblent indiquer qu'il existe toujours un effet protecteur du mutant non mitochondrial de Bcl-x<sub>L</sub>, notamment contre le mutant Bax S184D qui n'induit plus de libération de cytochrome c en présence de Bcl-x<sub>L</sub> A221R. Ces résultats doivent toutefois être considérés avec une grande précaution tant que les problèmes d'expression des deux protéines n'auront pas été résolus.

Le comportement du mutant A221R et sa propension à pouvoir inhiber Bax devront également être testés dans le modèle de cellules humaines. Notamment devront être caractérisés : la localisation de Bcl-x<sub>L</sub> A221R lors de l'induction de l'apoptose et son rôle antiapoptotique.

## 2.4 Discussion

Le rôle antiapoptotique de Bcl-x<sub>L</sub>, tel qu'il est connu dans les cellules animales, est bien conservé dans notre système d'étude. La coexpression de Bcl-x<sub>L</sub> et d'un mutant actif de Bax, tel que le mutant S184D, réprime la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe et la libération du cytochrome c. Cependant, alors que certaines hypothèses attribuent la fonction antiapoptotique de Bcl-x<sub>L</sub> sur Bax à sa capacité à réprimer l'adressage de Bax vers la mitochondrie, les résultats présentés ici montrent que Bcl-x<sub>L</sub> n'intervient pas sur cette étape d'adressage de Bax vers la mitochondrie. Au contraire, dans notre système d'étude, Bcl-x<sub>L</sub> favorise la localisation mitochondriale de variants peu adressés de Bax. Toutefois malgré la présence de Bax dans le compartiment mitochondrial, Bcl-x<sub>L</sub> est capable, dès lors que l'interaction entre les deux protéines est conservée, d'inhiber la libération du cytochrome c. Bcl-x<sub>L</sub> ne semble par ailleurs pas jouer de rôle majeur sur la capacité de Bax à s'insérer dans la membrane mitochondriale.

Nos résultats suggèrent que Bcl-x<sub>L</sub> puisse tout à fait intervenir lors des étapes tardives du processus d'activation de Bax et inhiber son activation, c'est-à-dire même lorsque Bax est déjà mitochondriale et insérée dans la membrane. Il reste donc à caractériser le rôle exact de Bcl-x<sub>L</sub> sur Bax dans la membrane. Il reste envisageable qu'en dépit de la présence de Bax dans la membrane, Bcl-x<sub>L</sub> empêche la libération de domaines critiques de Bax et que l'insertion dans la membrane ne soit que partielle. La résistance de Bax à un agent chaotrope en présence de Bcl-x<sub>L</sub> peut être également associée à la présence de Bcl-x<sub>L</sub> elle-même. Si l'on imagine que Bcl-x<sub>L</sub> empêche l'insertion de Bax dans la membrane, il est possible que ce soit Bcl-x<sub>L</sub> qui assure la résistance au traitement par le carbonate de sodium en agissant comme un point d'ancrage pour Bax. Ce point pourrait éventuellement être étudié par des expériences de protéolyse ménagée sur mitochondries isolées. Dans le cas où Bax serait effectivement insérée dans la membrane mitochondriale il devrait y avoir une résistance partielle de la protéine à la protéolyse. L'utilisation d'anticorps dirigés contre différents épitopes de Bax permettraient alors de déterminer les domaines insérés.

D'autre part il reste à étudier le rôle de Bcl-x<sub>L</sub> sur la capacité d'oligomérisation de Bax. Dans l'hypothèse où l'insertion de Bax dans la membrane mitochondriale n'est pas affectée, son oligomérisation reste une étape pouvant être contrôlée par Bcl-x<sub>L</sub>. Des tentatives de pontage des oligomères et éventuellement de complexes impliquant Bax et Bcl-x<sub>L</sub> ont été réalisées mais sont à l'heure actuelle restées infructueuses.

### 3 Un double rôle pour Bcl-x<sub>L</sub> ?

#### 3.1 Le rôle particulier de Bcl-x<sub>L</sub> ΔC

Avant de construire les mutants ponctuels de l'hélice transmembranaire de Bcl-x<sub>L</sub> notre première approche de l'étude du rôle de la localisation mitochondriale de Bcl-x<sub>L</sub> a été réalisée avec un variant de Bcl-x<sub>L</sub> dépourvu de ce segment terminal (Bcl-x<sub>L</sub>ΔC). Les premiers résultats ont montré que la localisation mitochondriale n'était pas complètement abolie pour Bcl-x<sub>L</sub>ΔC (Figure 44).

Lorsque ce variant est coexprimé avec la forme native de Bax, il induit son adressage vers la mitochondrie. Ce résultat est tout à fait similaire à celui obtenu avec la forme entière de Bcl-x<sub>L</sub>.

Afin de comparer le comportement de la forme native de Bcl-x<sub>L</sub> et de la forme dépourvue de l'hélice transmembranaire, des essais de co-immunoprécipitation ont été réalisés avec les différents variants de Bax de la même manière que décrit auparavant.

Alors que Bax et la forme entière de Bcl-x<sub>L</sub> interagissent, avec aucun des variants de Bax il n'a été possible de détecter une interaction entre Bax et Bcl-x<sub>L</sub>ΔC (Figure 48).

Bien qu'aucune interaction n'ait été mise en évidence entre les protéines par co-immunoprécipitation, le comportement de Bax est altéré par Bcl-x<sub>L</sub>ΔC, l'adressage de la protéine vers la mitochondrie étant stimulé. La perméabilisation de la mitochondrie induite par Bax a été mesurée en quantifiant les cytochromes mitochondriaux et met en évidence qu'en présence de Bcl-x<sub>L</sub>ΔC, Bax est très fortement activée. Cette activation est dépendante d'une interaction entre Bax et Bcl-x<sub>L</sub>ΔC car le mutant Bcl-x<sub>L</sub>ΔC G138A, ne pouvant interagir avec Bax, n'induit pas son activation (Figure 49).

Bcl-x<sub>L</sub> et Bcl-x<sub>L</sub>ΔC ont un comportement tout à fait différent et influencent Bax de façon opposée. La forme entière de Bcl-x<sub>L</sub> interagit fortement avec Bax et est capable d'inhiber un variant actif de Bax. La forme dépourvue de l'hélice α C-terminale transmembranaire (Bcl-x<sub>L</sub>ΔC) n'est plus capable d'inhiber Bax. La perméabilisation de la mitochondrie par le mutant actif Bax S184D, réprimée par la présence de la forme entière de Bcl-x<sub>L</sub>, n'est pas inhibée par Bcl-x<sub>L</sub>ΔC (Figure 50).

En plus de la perte de sa fonction antiapoptotique, Bcl-x<sub>L</sub>ΔC active la forme native, normalement inactive, de Bax. Bien qu'aucune interaction ne puisse être détectée entre les protéines par co-immunoprécipitation, celle-ci semble nécessaire pour conduire à l'activation de Bax. En effet le mutant d'interaction Bcl-x<sub>L</sub>ΔC G138A, incapable d'interagir avec Bax, n'entraîne plus son activation.

Une hypothèse expliquant cette observation est que la forme tronquée Bcl-x<sub>L</sub>ΔC puisse interagir avec Bax, comme le ferait Bcl-x entière, mais que l'absence de l'hélice C-terminale affecte la stabilité de cette interaction. Ainsi il est envisageable que l'interaction entre Bax et Bcl-x<sub>L</sub>ΔC favorise dans un premier temps l'adressage de Bax vers la mitochondrie. D'autre part il est également possible que l'interaction entre les deux protéines permette le changement de conformation de Bax qui, du fait de la faible stabilité de l'interaction avec la forme Bcl-x<sub>L</sub>ΔC, se retrouve rapidement libéré dans une conformation pouvant entraîner la relocalisation du cytochrome c.

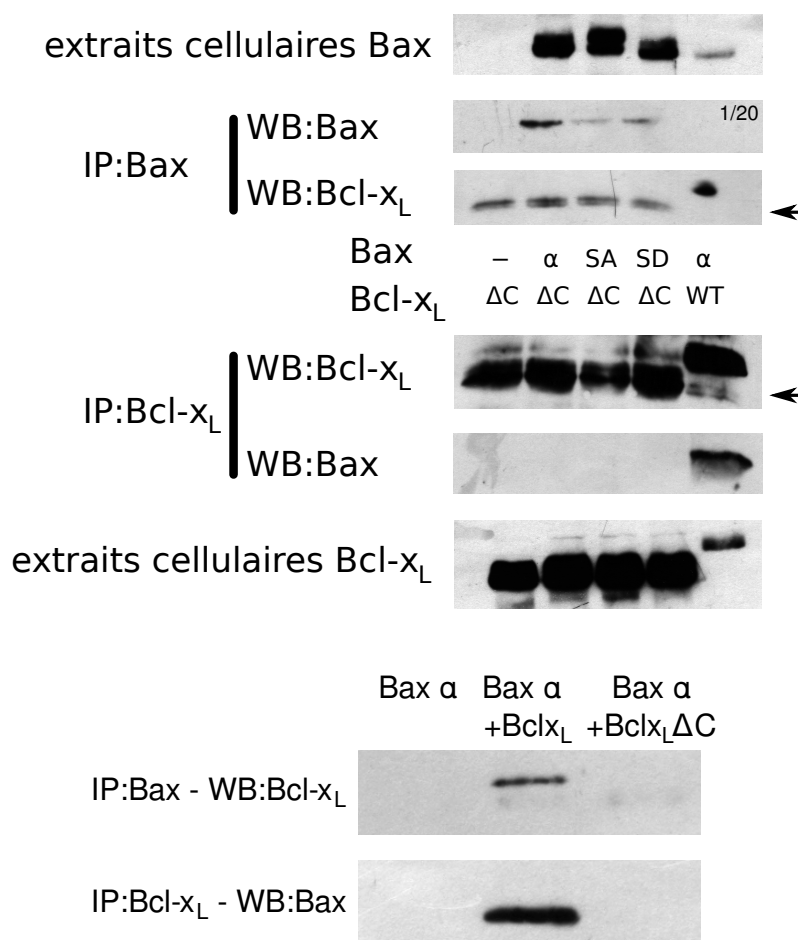
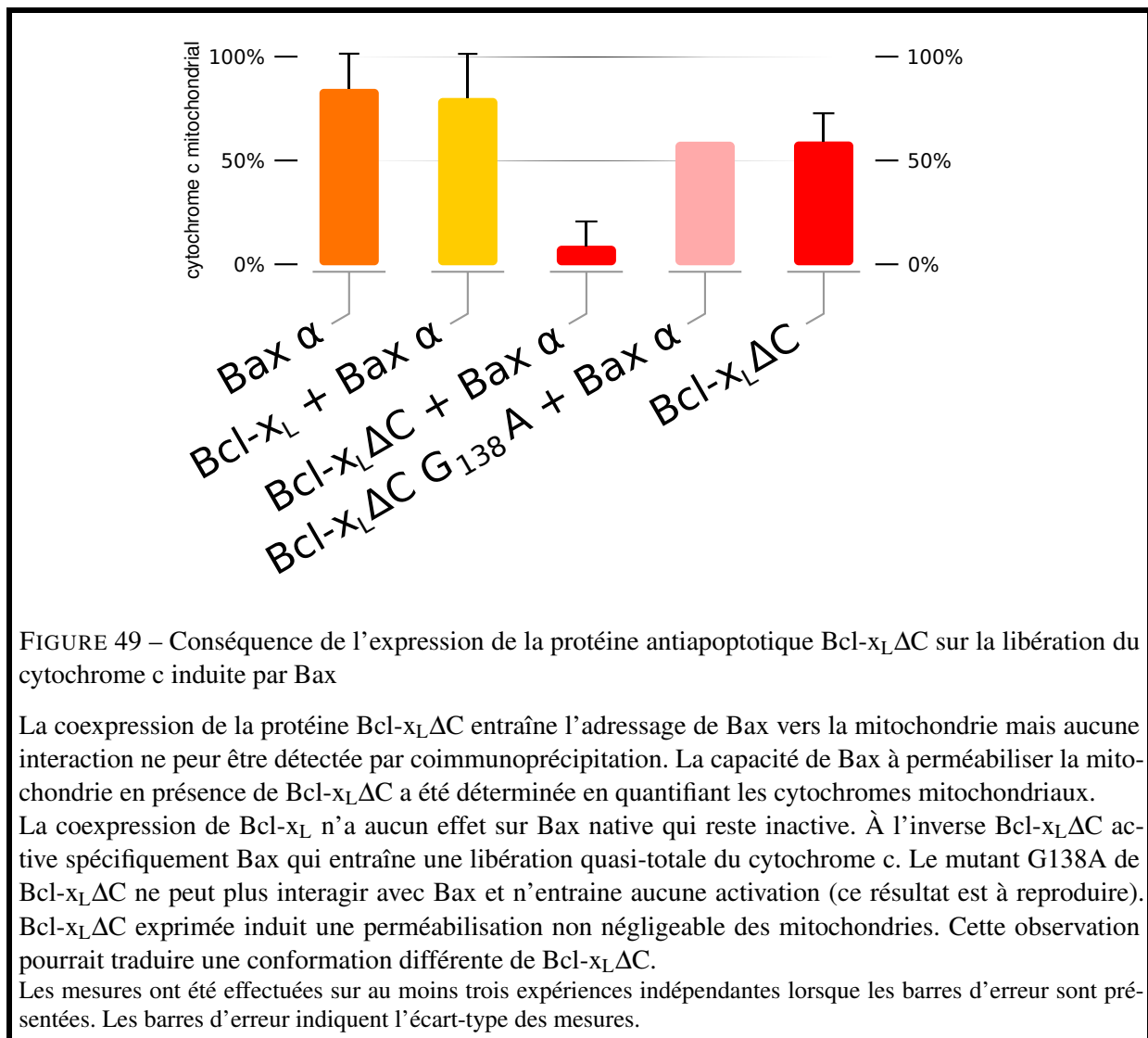


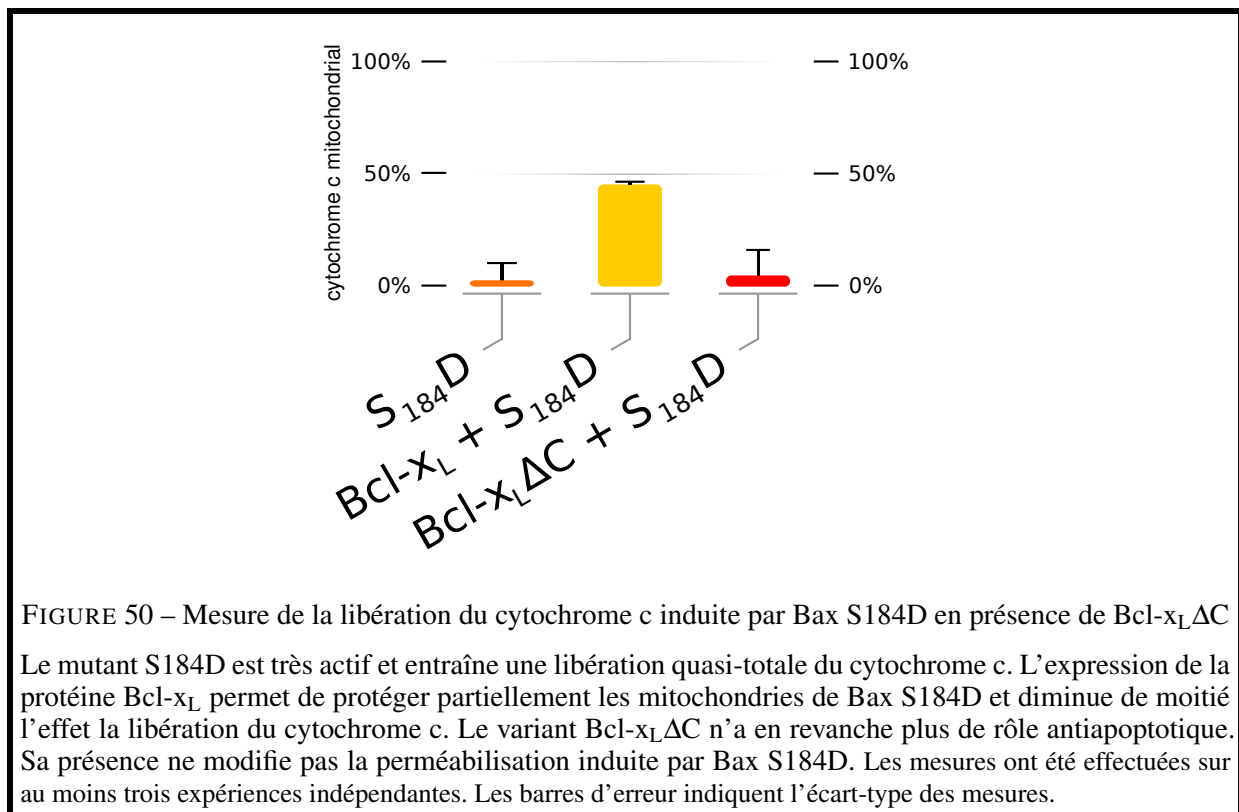
FIGURE 48 – Interaction entre Bax et Bcl-x<sub>L</sub>ΔC

La coimmunoprécipitation de Bax et Bcl-x<sub>L</sub> met en évidence que seule la forme entière de Bcl-x<sub>L</sub> mais pas la forme dépourvue du segment transmembranaire Bcl-x<sub>L</sub>ΔC interagit de façon stable avec Bax. En dépit d'un niveau cellulaire plus faible en Bax et Bcl-x<sub>L</sub> pour la souche coexprimant les deux formes natives des protéines, l'interaction est bien mise en évidence. À l'inverse dans les souches exprimant Bcl-x<sub>L</sub>ΔC

**1/20** : les échantillons de protéines déposés correspondent à une dilution au 20ème de la fraction immunoprécipitée. La bande correspondant au puits n°5 est détectée (bien que faiblement) lorsque les échantillons sont déposés non dilués.

← : bande aspécifique à la taille exacte de Bcl-x<sub>L</sub>ΔC et correspond soit aux chaînes légères des immunoglobulines soit à une liaison aspécifique de Bcl-x<sub>L</sub>ΔC aux anticorps. La première hypothèse reste la plus probable car cette bande peut également être détectée dans une fraction comportant la forme entière de Bcl-x<sub>L</sub>.





### 3.2 Bad/ABT 737

Nous avons cherché à déterminer si les résultats obtenus avec Bcl-x<sub>L</sub>ΔC pouvaient être mis en évidence en utilisant cette fois la forme entière de Bcl-x<sub>L</sub> et en entraînant la rupture de l'interaction entre Bax et Bcl-x<sub>L</sub>. Afin de favoriser la rupture de l'interaction entre Bax et Bcl-x<sub>L</sub>, nous avons utilisé l'ABT737, une molécule analogue du domaine BH3 de la protéine à BH3-seulement Bad. L'ABT 737 a une affinité plus forte que Bax pour le sillon hydrophobe de Bcl-x<sub>L</sub> et déplace ainsi l'équilibre Bax/Bcl-x<sub>L</sub> vers la libération de Bax.

Lorsque Bax est exprimée chez la levure et est activée, la membrane mitochondriale est perméabilisée et le cytochrome c est libéré. La culture prolongée des levures en milieu respiratoire lorsque Bax est activée conduit à leur mort. Des levures exprimant Bax et Bcl-x<sub>L</sub> cultivées en présence d'ABT737 meurent significativement plus que des levures n'exprimant pas Bcl-x<sub>L</sub>. L'activation de Bax n'a lieu que lorsque Bcl-x<sub>L</sub> et l'ABT737 sont présents (Gautier et al., en révision). Ces résultats obtenus sur cellules entières montrent que Bcl-x<sub>L</sub> peut jouer un rôle indirect dans l'activation de Bax lorsque l'interaction Bax/Bcl-x<sub>L</sub> est déstabilisée par la présence de l'ABT737. Cependant l'activation de Bax est ici rapportée par une méthode indirecte (la mort des levures) et ne permet pas de caractériser les mécanismes mis en jeu. C'est pourquoi nous avons tenté de reproduire cette activation sur mitochondries isolées.

Une fraction enrichie en mitochondries d'une souche de levure coexprimant Bax et Bcl-x<sub>L</sub> a été diluée dans un tampon iso-osmotique pour les mitochondries et incubée en présence de différentes concentrations d'ABT737 (10 nM à 100 nM) pendant quelques heures ou toute la nuit. Les mitochondries ont ensuite été récoltées et les cytochromes quantifiés par spectrométrie dans la fraction mitochondriale et le surnageant. Dans le cas où Bax serait activée, une diminution de la concentration en cytochrome c dans la fraction mitochondriale conjointement à une augmentation dans le surnageant doit être observée.

Il n'a été observé aucune libération de cytochrome c en comparaison de la souche témoin non traitée à l'ABT737 (Figure 51). Afin de favoriser la libération du cytochrome c, l'expérimentation a également été réalisée dans un tampon salin (KCl 0,3 M, Tris Maléate 10 mM, pH 6,8) qui provoque le détachement des protéines faiblement insérées dans les membranes. Un résultat identique a été obtenu dans ces conditions et aucune libération de cytochrome c n'a été observée sur les mitochondries traitées à l'ABT737. D'une façon identique, la quantification des cytochromes dans le surnageant ne montre aucune libération significative du cytochrome c en présence d'ABT737.

Sur mitochondries isolées d'une souche de levure exprimant Bax et Bcl-x<sub>L</sub> la présence d'ABT737 n'a aucun effet sur l'activation de Bax. Nous n'avons cependant pas encore vérifié que la présence de l'ABT737 déstabilise effectivement l'interaction entre Bax et Bcl-x<sub>L</sub>. Il est également possible que l'activation de Bax n'ait lieu que si les mitochondries sont parfaitement fonctionnelles et énergisées. Pour cela il serait envisageable de réaliser l'expérimentation en présence d'un substrat respiratoire tel que l'éthanol. Par ailleurs la présence d'ATP est requise *in vitro* pour que Bax s'insère dans des mitochondries de levures isolées (Priault *et al.*, 1999). Nous avons tenté de réaliser l'expérience en présence d'ATP mais sans différence dans les résultats.

Nous avons également envisagé l'expression du peptide correspondant au BH3 de la protéine proapoptotique à BH3-seulement Bad afin de modifier l'interaction entre Bax et Bcl-x<sub>L</sub> directement dans la levure. Bad est en effet un partenaire de Bcl-x<sub>L</sub> mais n'interagit pas avec Bax. La séquence nucléotidique

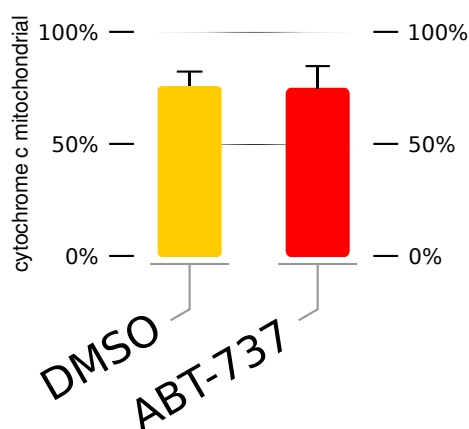


FIGURE 51 – Caractérisation de l'effet de la rupture de l'interaction Bax/Bcl-x<sub>L</sub> sur l'état d'activation de Bax

Des mitochondries de levure exprimant Bax et Bcl-x<sub>L</sub> ont été diluées et incubées en absence (DMSO) ou en présence de 100 nM d'ABT737. Après incubation les mitochondries sont centrifugées pour éliminer le surnageant et les cytochromes mitochondriaux ont été quantifiés par spectrophotométrie.

En présence d'ABT737 aucune activation de Bax n'est observée. La quantité de cytochromes mitochondriaux reste identique.

Les mesures ont été effectuées sur au moins trois expériences indépendantes. Les barres d'erreur indiquent l'écart-type des mesures.

codant pour le BH3 de Bad a été fusionnée à celle de l'étiquette FLAG et clonée dans un plasmide sous le contrôle du promoteur GAL1. Bax et Bcl-x<sub>L</sub> ont été exprimées sous le contrôle d'un promoteur Tet-off afin de pouvoir dissocier leur expression de celle du peptide du BH3 de Bad, la stratégie étant de coexprimer Bax et Bcl-x<sub>L</sub> puis de dissocier l'interaction par l'expression du peptide en ajoutant du galactose au milieu de culture. L'expression du BH3 de Bad n'a pour le moment pas pu être mise en évidence. De par la petite taille du peptide étiqueté (15+8 acides aminés) il est difficile de savoir si l'absence de détection est due à la méthode de détection elle-même (gel de polyacrylamide et transfert sur membrane) qui entraînerait la perte du peptide ou bien si l'expression ou la stabilité du peptide est faible.

Le clonage du BH3 de Bad seul a au départ été réalisé pour des contraintes techniques. Il est effet possible de construire la séquence nucléotidique artificiellement grâce à de longs oligonucléotides. L'expression de la forme entière de la protéine serait une approche à la fois plus proche des conditions physiologiques et permettrait de meilleures conditions d'expression et de caractériser plus facilement l'interaction avec Bcl-x<sub>L</sub>.

## 4 Discussion

La détermination des mécanismes moléculaires d'inhibition des Bax par les protéines antiapoptotiques de la famille Bcl-2 est une étape importante de la compréhension des mécanismes de perméabilisation de la membrane mitochondriale. S'il paraît clair que cette inhibition passe en partie par une interaction directe entre Bax et ses partenaires antiapoptotiques, les étapes de l'activation de Bax qui

sont contrôlées par cette interaction sont encore mal connues. Plusieurs grandes hypothèses existent pour expliquer le rôle des protéines antiapoptotiques sur Bax. Elles pourraient intervenir en empêchant l'adressage de Bax vers la mitochondrie, en empêchant son insertion dans la membrane mitochondriale, en défavorisant la formation d'oligomères des Bax ou encore en interagissant avec des oligomères déjà existants. Nous avons ici étudié les étapes précoces de l'activation de Bax en déterminant le rôle de Bcl-x<sub>L</sub> sur l'adressage vers la mitochondrie et l'insertion de Bax dans la membrane. Nous avons également déterminé le rôle général de Bcl-x<sub>L</sub> sur la perméabilisation induite par Bax en mesurant la libération du cytochrome c.

Nos résultats montrent d'une façon tout à fait classique que Bcl-x<sub>L</sub> réprime l'activation de variants de Bax capables de perméabiliser la membrane. Dans nos conditions expérimentales nous avons pu déterminer que l'inhibition induite par Bcl-x<sub>L</sub> a lieu dans le compartiment mitochondrial. Plus généralement, la présence de Bcl-x<sub>L</sub> favorise même la présence dans la mitochondrie de variants initialement non mitochondriaux de Bax tout en réprimant la libération du cytochrome c. Nous avons également déterminé que Bcl-x<sub>L</sub> n'intervient vraisemblablement pas au niveau de l'étape d'insertion de Bax dans la membrane. En effet, en présence de Bcl-x<sub>L</sub>, le mutant de Bax S184D est toujours inséré dans la membrane bien que sa capacité de perméabilisation de la mitochondrie soit fortement réprimée.

L'utilisation du variant Bcl-x<sub>L</sub>ΔC ne semble pas appropriée pour cette étude. Sa localisation mitochondriale n'est en effet pas complètement abolie. D'autre part il semble que la perte de l'hélice C-terminale puisse affecter la fonction de Bcl-x<sub>L</sub>. Nous avons donc construit un mutant comportant un résidu chargé positivement dans l'hélice C-terminale, le mutant A221R. Nous avons mis en évidence dans la levure, ainsi que dans des cellules humaines en culture que le mutant Bcl-x<sub>L</sub> A221R n'est plus membranaire. Ce mutant représentera un outil important pour l'étude du rôle de la localisation mitochondriale de Bcl-x<sub>L</sub>. La coexpression du mutant Bax S184D et de Bcl-x<sub>L</sub> A221R dans la levure permettra de déterminer si la présence de Bcl-x<sub>L</sub> dans la mitochondrie est indispensable à son effet protecteur. L'étude de la fonction antiapoptotique de Bcl-x<sub>L</sub> A221R dans des cellules animales permettra d'étudier l'effet de cette mutation par une approche plus générale et plus intégrée.

Gardai *et al.* (2004) ont observé par co-immunoprécipitation une augmentation de l'interaction entre Bax et Bcl-x<sub>L</sub> lorsque Bax est phosphorylée par Akt sur la sérine 184. Nous avons donc mesuré l'interaction entre Bax et Bcl-x<sub>L</sub> en utilisant les mutants mimant la présence ou l'absence d'une phosphorylation sur le résidu 184. Nous n'avons observé aucune différence d'interaction avec Bcl-x<sub>L</sub> entre Bax native et Bax S184A. La présence moindre de Bax S184D dans les cellules rend impossible la quantification et ne permet pas de comparer son interaction avec les autres variants de Bax. Nous envisageons d'une part d'utiliser d'autres approches afin de quantifier l'interaction entre les variants de Bax et Bcl-x<sub>L</sub> ainsi que d'étudier les événements se produisant et les interactions mises en jeu lors d'une coexpression de Bax, Bcl-x<sub>L</sub> et Akt.

L'augmentation de la quantité de Bax dans la fraction mitochondriale lors de l'expression de Bcl-x<sub>L</sub> suggère que Bcl-x<sub>L</sub> puisse être un activateur indirect de Bax. L'accessibilité du domaine BH3 de Bax, impliqué dans l'interaction avec Bcl-x<sub>L</sub>, suppose un mouvement de la partie C-terminale de Bax similaire à celui obtenu par exemple avec le mutant P168A. En favorisant la mobilité de l'hélice α9 cette mutation entraîne la relocalisation de Bax vers la mitochondrie et son activation. Lors de l'interaction

entre Bax et Bcl-x<sub>L</sub>, nous supposons que Bax puisse être piégée dans une conformation proche de sa conformation active. Dans cette hypothèse la présence d'une protéine antiapoptotique et d'une protéine à BH3-seulement dérépresseur suffirait à entraîner l'activation de Bax. La protéine antiapoptotique permettrait un changement de conformation de Bax tout en la maintenant piégée par l'interaction. La présence d'une protéine à BH3-seulement dérépresseur permettrait la libération de Bax sous une forme active et le déclenchement de l'apoptose.

Le variant Bcl-x<sub>L</sub>ΔC a un comportement très différent de celui de Bcl-x<sub>L</sub>. Il n'interagit plus que de manière transitoire avec Bax et ne protège plus la mitochondrie de mutants actifs tels que le mutant S184D. Nos résultats montrent que ce variant de Bcl-x<sub>L</sub> entraîne une activation de Bax native et la libération presque totale du cytochrome c. Cette activation est directe et dépendante de l'interaction entre Bax et Bcl-x<sub>L</sub> puisque la mutation G138A dans le BH1 de Bcl-x<sub>L</sub>ΔC l'abolit. Cette observation est en accord avec l'hypothèse précédente. L'interaction entre Bax et Bcl-x<sub>L</sub>ΔC a toujours lieu *via* le sillon hydrophobe de Bcl-x<sub>L</sub> puisque la mutation G138A abolit l'activation de Bax. L'impossibilité de caractériser cette interaction par co-immunoprécipitation indique qu'elle est probablement transitoire. Dans ces conditions Bax serait bien activée en subissant un changement de conformation favorisé par l'interaction avec Bcl-x<sub>L</sub>ΔC et serait aussitôt libérée sous forme active.



# Mise en œuvre d'une méthode de criblage

## Sommaire

|     |                                          |     |
|-----|------------------------------------------|-----|
| 1   | Problématique . . . . .                  | 133 |
| 2   | Immunofluorescence sur levures . . . . . | 134 |
| 3   | Étiquetage . . . . .                     | 134 |
| 3.1 | Étiquette tétracystéine . . . . .        | 135 |
| 3.2 | Split GFP . . . . .                      | 138 |

## 1 Problématique

Comme il a été montré précédemment, la levure représente un paradigme original pour l'étude des mécanismes moléculaires de Bax. L'absence d'homologues des protéines de la famille Bcl-2 et de protéines impliquées dans l'apoptose en fait un candidat idéal pour décomposer les mécanismes moléculaires d'activation de Bax en éléments simples tels que l'interaction protéine-protéine avec un partenaire, le rôle d'une mutation ou d'une modification post-traductionnelle.

Ici nous envisageons l'utilisation de la levure comme un outil facilitant le crible de molécules permettant de moduler l'activation de Bax mais aussi de mutants de Bax ou de ses partenaires. Jusqu'à présent l'activation de Bax est caractérisée dans notre système d'étude par trois étapes. En premier lieu la capacité d'adressage vers la mitochondrie est révélée par la présence de Bax dans une fraction purifiée de mitochondries. L'insertion de Bax dans la membrane mitochondriale externe, nécessaire à la formation du pore, est déterminée par un traitement par un agent chaotrope, le carbonate de sodium, qui décroche de la membrane les protéines en interaction mais non insérées. Enfin la propension de Bax à former un pore fonctionnel est caractérisée par la libération du cytochrome c en quantifiant les différents cytochromes mitochondriaux par spectrophotométrie sur mitochondries isolées.

Ces méthodes, bien que fiables, nécessitent une grande quantité de matériel biologique et donc de matériel expérimental tel que milieux de cultures, tampons d'extraction des mitochondries ainsi que de matériel pour l'analyse des extraits.

L'adressage de Bax peut être caractérisé par une technique simplifiée consistant à séparer les membranes et le cytosol par centrifugation sur des petites quantités de cellules après une lyse mécanique avec

des billes de verre. Quelques millilitres d'une culture en milieu de phase exponentielle sont suffisants pour réaliser ce fractionnement. En revanche la quantification des cytochromes mitochondriaux requiert plusieurs milligrammes de mitochondries et nécessite donc une culture de levures d'un volume d'un à deux litres de milieu. Par ailleurs la préparation des mitochondries est une opération longue et délicate. Il n'est ainsi pas envisageable de réaliser une extraction de mitochondries sur plus de 5 à 6 souches en parallèle.

L'objectif de cette partie est d'étudier la possibilité d'un système rapporteur de l'activation de Bax en utilisant *Saccharomyces cerevisiae*. Ce système permettrait de caractériser l'activation de Bax par une méthode simple dans le but de réaliser une première sélection de molécules ou de mutants qui seraient par la suite étudiés en suivant les méthodes décrites dans les deux premières parties.

## 2 Immunofluorescence sur levures

Nous avons dans un premier temps envisagé de suivre l'adressage de Bax vers la mitochondrie et la libération du cytochrome c par immunofluorescence. Le principe consiste à fixer les cellules avec du paraformaldéhyde afin de figer leur état puis à perméabiliser les cellules par différentes méthodes (détergents, zymolyase, HCl, solvants) pour permettre l'entrée des anticorps dans les cellules fixées. Après une saturation à la BSA dans le but d'éviter la fixation aspécifique des anticorps, les cellules sont incubées en présence d'un anticorps dirigé contre le cytochrome c ou contre Bax puis avec un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome. La localisation des protéines est ensuite observée au microscope.

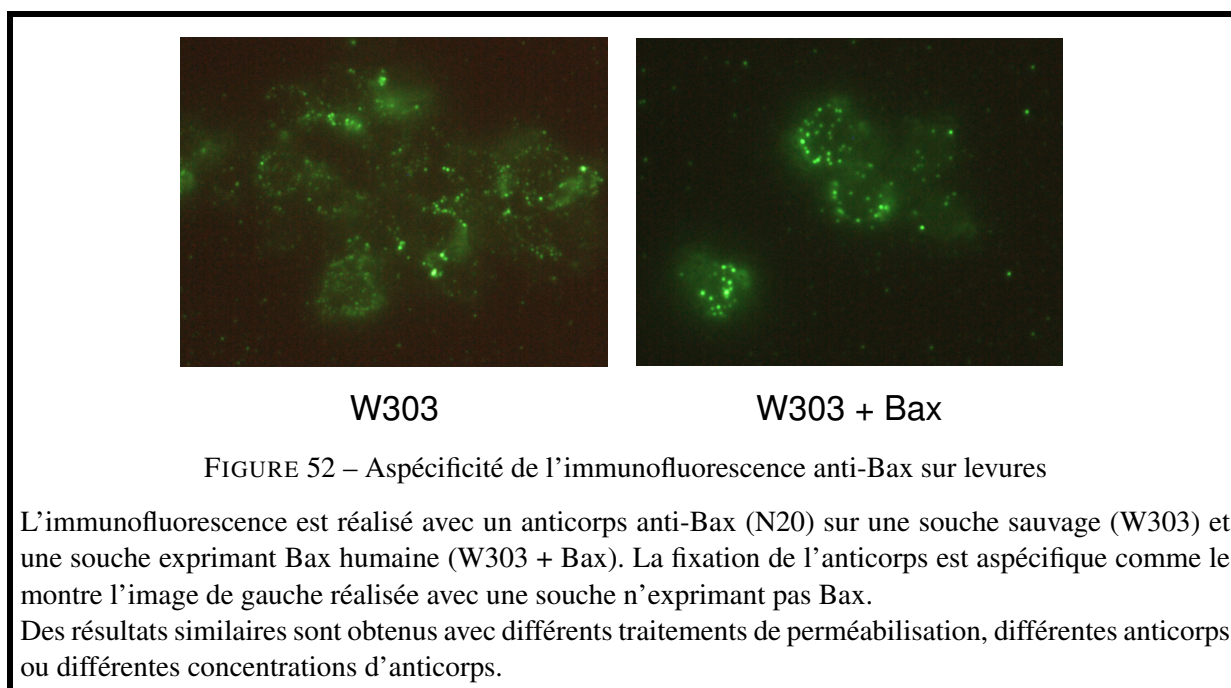
Cette méthode s'est avérée relativement difficile à mettre en place pour plusieurs raisons. La perméabilisation des cellules est une étape délicate et peu reproductible puisqu'elle dépend de l'état physiologique des cellules et des propriétés de la paroi. Il est par conséquent impossible de prévoir si les levures vont être correctement perméabilisées en présence des molécules ou conditions testées. Par ailleurs les traitements effectués sur les levures sont assez drastiques et constituent une étape susceptible de modifier significativement l'organisation interne des cellules. Nous avons observé que les traitements effectués modifient profondément la morphologie des levures. À l'inverse une trop faible perméabilisation semble empêcher l'entrée des anticorps dans les cellules. Dans les conditions testées, les anticorps se fixent également aspécifiquement (Figure 52). Enfin le résultat étant fortement dépendant des conditions expérimentales il est nécessaire de réaliser un grand nombre de contrôles (anticorps secondaires seuls, souches avec ou sans Bax...) qui augmentent le nombre d'observations à réaliser.

Cette technique apparaît donc trop délicate à mettre en œuvre pour tester un grand nombre de conditions.

## 3 Étiquetage

Afin de nous affranchir de l'étape de perméabilisation des cellules et de l'utilisation d'anticorps nous avons entrepris de marquer directement le cytochrome c pour suivre son évolution.

La taille du pore formé par Bax étant estimée à environ la taille du cytochrome c (environ 3–4 nm) il paraît peu approprié de fusionner directement au cytochrome c une protéine fluorescente dont la taille



est très supérieure. Par exemple la GFP a une masse de 26,9 kDa contre 12,5 kDa pour le cytochrome c ce qui risque d’affecter la libération du cytochrome c et de rendre les observations non nécessairement représentatives de la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe induite par Bax (Roucou *et al.*, 2000).

### 3.1 Étiquette tétracystéine

L’étiquette tétracystéine est un motif constitué de 4 cystéines groupées deux à deux. Les deux groupes sont séparés par une proline et une glycine (CCPGCC). Le motif ainsi obtenu forme une boucle capable de fixer des molécules fluorescentes (par exemple un dérivé de la fluorescéine) contenant un motif bi-arsenic (4’,5’-bis(1,3,2-dithioarsolan-2-yl)fluorescéine). Les atomes d’arsenic ont une forte affinité pour les thiols. Le dérivé de la fluorescéine est initialement complexé avec de l’éthanedithiol qui le rend non fluorescent. Cette molécule est perméante et peut passer à travers la paroi et la membrane plasmique des levures. Lorsque la molécule est à proximité du motif tétracystéine elle peut s’y fixer, l’interaction avec le thiol inhibiteur est rompue et elle devient alors fluorescente (Griffin *et al.*, 1998).

Afin de localiser le cytochrome c dans la levure, nous avons construit une souche exprimant une forme du cytochrome c étiquetée en C-terminal avec ce motif tétracystéine. Il est possible de modifier un gène au locus assez aisément chez *Saccharomyces cerevisiae* en raison de sa capacité à réaliser de la recombinaison homologue. Lorsque la levure est transformée avec un brin d’ADN qui possède des extrémités homologues de parties d’un gène, une double recombinaison est possible avec une fréquence de  $10^{-4}$  à  $10^{-6}$  et conduira au remplacement du fragment de gène endogène par le fragment inséré. Afin de générer le fragment de recombinaison, nous avons utilisé un plasmide incluant le motif tétracystéine (pU-TetCys) suivi d’une cassette de résistance à la kanamycine comme matrice PCR. Un couple d’amorces dont la première est homologue de la fin du gène du cytochrome c et du début du motif tétracystéine

et la seconde de la fin de la cassette de résistance et du début du terminateur du cytochrome c permet l'obtention du fragment de recombinaison (Figure 53). La cassette de résistance à la kanamycine permet la sélection des transformants ayant intégré le fragment dans leur génôme. La recombinaison est vérifiée par un séquençage du locus du gène du cytochrome c.

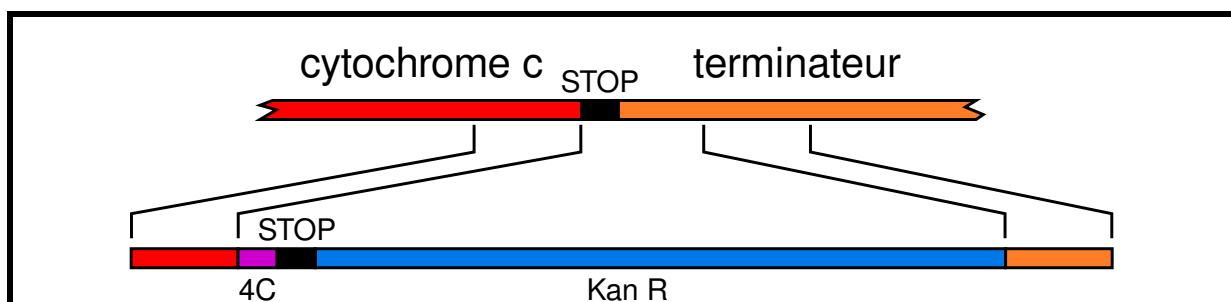


FIGURE 53 – Ajout d'une étiquette au locus par recombinaison homologue.

Le fragment de recombinaison (en bas) est obtenu par PCR à partir d'un plasmide. Ce fragment comporte à chaque extrémité une séquence homologue, respectivement de la fin du gène à étiqueter (sans le codon STOP) et d'une partie du terminateur du gène. En plus de l'étiquette, une cassette de résistance à un antibiotique (ici KanR) est insérée et permet la sélection des recombinants.

Plusieurs clones ont été obtenus par cette méthode. Nous avons dans un premier temps déterminé l'impact de l'étiquette sur la croissance des levures sur substrat respiratoire. La première observation est que la souche comportant un cytochrome c étiqueté avec le motif tétracystéine croît plus difficilement que la souche sauvage. La respiration des cellules entières peut être mesurée par la consommation de dioxygène des levures (Figure 54). Nous avons observé que la souche dont le cytochrome est étiqueté respire sensiblement moins que la souche sauvage.

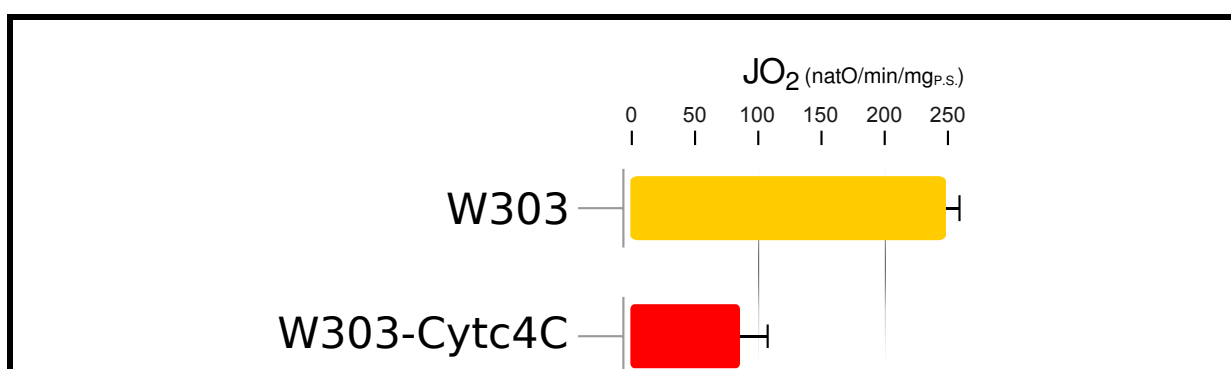


FIGURE 54 – Mesure de la respiration de la souche exprimant un cytochrome c étiqueté tétracystéine

La respiration mitochondriale a été mesurée sur cellule entière avec un oxygraphe en milieu de phase stationnaire (DO de 2).

La souche dont le cytochrome c est étiqueté tétracystéine (W303-Cytc4C) a une consommation d'oxygène presque trois fois inférieure à celle de la souche témoin (W303).

Les mesures ont été effectuées sur deux expériences indépendantes pour la souche W303 et trois pour la souche W303-Cytc4C. Les barres d'erreur indiquent l'écart type des mesures.

La réalisation d'un spectre d'absorbance en conditions oxydée et réduite sur cellules entières permet de quantifier les cytochromes mitochondriaux totaux. De façon étonnante nous avons observé une absence totale d'absorbance à 550 nm pouvant indiquer l'absence du cytochrome c et c1 dans la mitochondrie (Figure 55). Cependant le fait que les levures puissent tout de même croître sur un milieu supplémenté en lactate, un substrat non fermentescible suggère que le cytochrome c soit un minimum fonctionnel. L'absence d'absorbance peut être expliquée par une modification des propriétés d'absorbance liées à l'hème. En effet le motif tétracystéine est relativement proche du motif de fixation de l'hème sur le cytochrome c qui comporte également deux cystéine (CLQC). La présence de l'étiquette pourrait altérer la fixation de l'hème et donc le fonctionnement et les propriétés physicochimiques du cytochrome c.

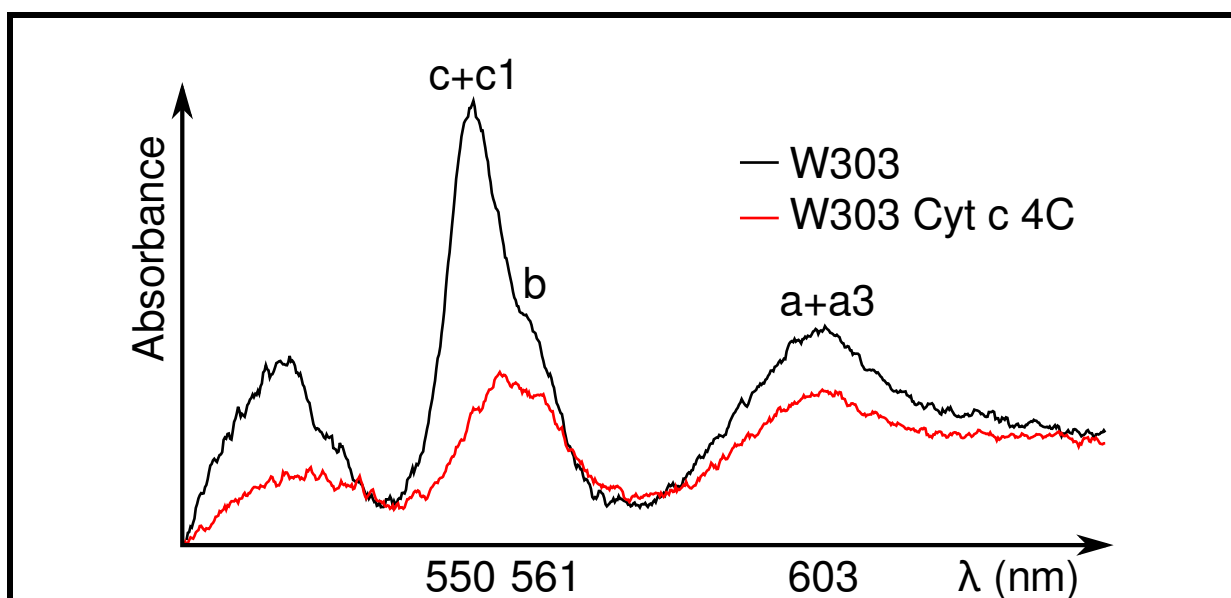


FIGURE 55 – Spectre d'oxydoréduction des cytochromes de la souche exprimant un cytochrome c étiqueté tétracystéine

Les cytochromes mitochondriaux ont été quantifiés sur cellules entières pour la souche W303 Cyt c-4C dont le cytochrome endogène a été étiqueté avec la séquence tétracystéine (en rouge) et pour la souche W303 en témoin (en noir).

La présence de l'étiquette tétracystéine entraîne un changement important du profil du spectre. Aucune absorbance n'est détectée à 550 nm. Deux hypothèses peuvent expliquer cette observation. La présence de l'étiquette peut avoir déstabilisé la protéine ou empêché son import dans la mitochondrie et la quantité de cytochrome c détectée est quasi nulle. L'étiquette peut également avoir modifié la fixation ou la position de l'hème en raison de sa forte ressemblance au motif de fixation de l'hème, ce qui pourrait se traduire par une modification des propriétés spectroscopique du cytochrome c.

Cette approche a également été écartée. La faible vitesse de croissance et l'altération de la respiration de cette souche dont le cytochrome c est étiqueté avec le motif tétracystéine apporte en premier lieu une part d'incertitude quant à l'état physiologique des levures. Même les étapes d'activation de Bax n'étaient pas modifiées par le changement d'état physiologique de cette souche, cette méthode possède

des inconvénients similaires à l'approche par immunofluorescence (faible reproductibilité, difficulté de mise au point des conditions, coût des réactifs).

## 3.2 Split GFP

Nous avons récemment envisagé une troisième stratégie afin de constituer un système rapporteur de la libération du cytochrome c suite à l'activation de Bax dans la levure. La GFP est une protéine fluorescente structurée en tonneau  $\beta$  au centre duquel un chromophore est présent. La fluorescence du chromophore de la GFP est protégée de l'effet désactivateur du milieu par le tonneau  $\beta$  formé de 11 brins antiparallèles qui l'entourent. Il est possible d'exprimer séparément les deux parties de la GFP scindée qui une fois reconstituée sous sa forme entière restaure la fluorescence de la protéine, cependant le repliement de la GFP est souvent une étape limitante dans la reformation d'une protéine fonctionnelle. En 2006 une nouvelle forme de GFP scindée a été développée, basée sur un variant de la GFP dont le repliement est favorisé. Par ailleurs, contrairement à la majorité des systèmes de GFP scindée dont les fragments sont d'une taille globalement équivalente, celui-ci est composé d'une partie comprenant la quasi-totalité de la GFP (GFP 1–10) et d'un petit fragment correspondant à un unique brin  $\beta$  (GFP 11) (Cabantous *et al.*, 2005). L'avantage de ce système est d'une part qu'il n'est fluorescent que lorsque les deux fragments sont réunis mais surtout que la taille du petit fragment n'est que de 16 acides aminés. Il est ainsi parfaitement envisageable d'utiliser ce fragment comme étiquette sur le cytochrome c. La stratégie envisagée est la suivante : en coexprimant le cytochrome c étiqueté avec le fragment GFP 11 et la partie GFP 1–10 cytosolique il serait possible de n'obtenir une fluorescence que lorsque le cytochrome c serait libéré de la mitochondrie vers le cytosol. Ainsi l'apparition de fluorescence dans une souche de levure exprimant Bax permettrait de caractériser la libération du cytochrome c et donc l'activation de Bax.

Ce système posséderait l'avantage, comparé aux stratégies présentées précédemment, de ne nécessiter que la mesure de la fluorescence et pourrait plus facilement être réalisée dans un crible grâce notamment à des méthodes automatisables telles que la cytométrie en flux ou la lecture en plaques.

### 3.2.1 Construction d'une souche comportant un cytochrome c étiqueté avec le fragment GFP 11

Une approche similaire à celle présentée pour l'étiquette tétracycline a été réalisée. Nous avons dans un premier temps modifié le plasmide pUTetCys utilisé précédemment afin de générer un plasmide comportant le fragment GFP 11 (remplaçant le motif tétracycline sur le pUTetCys) suivi de la cassette de résistance à la kanamycine. Le pU TetCys a été digéré pour éliminer le motif tétracycline et la séquence GFP 11 a été insérée en remplacement par ligation. Le plasmide obtenu, nommé pU GFP 11, a été utilisé comme matrice pour la génération par PCR du fragment de recombinaison homologue. Des levures ont été transformées par ce fragment mais aucun clone ayant effectivement intégré le fragment au locus n'a pour l'instant pu être obtenu.

Nous envisageons, dans un premier temps, de fusionner la séquence du domaine GFP 11 au cytochrome c sur plasmide afin de valider notre approche. Par la suite l'intégration de l'étiquette au locus du gène du cytochrome c sera une étape nécessaire afin d'obtenir une souche exprimant les composants du système rapporteur sans utiliser de plasmide, afin d'assurer la stabilité génétique de la souche. Il est en effet difficile de transformer et de maintenir une souche contenant trois plasmides différents.

## **Troisième partie**

# **Discussion et perspectives**



## Discussion

Les travaux présentés au cours de cette thèse ont tenté d'apporter des informations moléculaires sur les mécanismes de régulation de l'activation de la protéine proapoptotique Bax. Afin de passer d'un état natif cytosolique et inactif à un état mitochondrial et actif, Bax doit changer de conformation et passer par plusieurs étapes d'activation. L'expression de Bax dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* a permis d'apporter des données sur deux des mécanismes contrôlant cette activation : tout d'abord sur la phosphorylation de Bax et le rôle des kinases Akt et GSK-3 $\beta$  puis sur le rôle de la protéine antiapoptotique Bcl-x<sub>L</sub>. Les résultats obtenus s'intègrent à l'ensemble des données connues sur les mécanismes d'activation de Bax et permettent de préciser le modèle de son activation.

### L'apport du paradigme levure

L'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation de Bax est une tâche relativement complexe. Des dizaines de partenaires de nature très variée ont été caractérisés ou proposés : des protéines de la famille Bcl-2 (Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-2, Bid, Bim...), des kinases (Akt/PKB, GSK-3 $\beta$ , PKC, p38MAPK, JNK...), des protéines solubles (Ku70, 14-3-3), des protéines mitochondriales (récepteurs, transporteurs, dynamines...), des facteurs de transcription (p53), des lipides (céramides)...

Cette palette d'interactions rend difficile la compréhension des mécanismes impliqués dans leurs détails moléculaires. Cette observation est d'autant plus vraie que les interactions peuvent être combinées entre différents partenaires de Bax et engendrent des degrés de complexité supplémentaires. L'utilisation de la levure permet d'individualiser les interactions de Bax avec ses partenaires en n'exprimant que certaines des protéines impliquées. Ainsi il est possible de décomposer les mécanismes étudiés en plusieurs étapes.

Les résultats obtenus avec le mutant phosphomimétique S184D ou avec la kinase Akt donnent un bon exemple de l'apport de l'expression de Bax dans la levure. L'activation d'Akt dans des neutrophiles conduit à l'inhibition de l'apoptose *via* la phosphorylation de Bax sur la sérine 184 et une interaction de Bax avec les protéines antiapoptotiques Bcl-x<sub>L</sub> et Mcl-1. L'expression de Bax dans un système simplifié a permis de montrer qu'Akt n'inhibe pas directement Bax mais entraîne un changement de conformation plaçant la protéine dans une conformation ouverte. Cette conformation conduit à l'activation de Bax dans la levure, en absence d'autres partenaires. La mise en évidence de ces étapes repose sur la possibilité de décomposition des mécanismes permise par l'utilisation de la levure et des mutants de Bax.

## L'activation de Bax est contrôlée par au moins deux étapes distinctes

La première étape du processus d'activation de Bax suppose son adressage vers la mitochondrie. Plusieurs partenaires, identifiés dans les cellules animales, pourraient participer à l'inhibition de l'adressage de Bax vers la mitochondrie. On trouve par exemple les protéines 14-3-3 (Nomura *et al.*, 2003), Ku70 (Cohen *et al.*, 2004; Subramanian *et al.*, 2005) ou encore des protéines antiapoptotiques de la famille Bcl-2 telles que Bcl-2 (Oltvai *et al.*, 1993), Bcl-x<sub>L</sub> ou Bcl-w (Zhai *et al.*, 2008). L'expression de Bax chez *Saccharomyces cerevisiae* conduit à une localisation cytosolique et inactive de la protéine (Priault *et al.*, 1999) suggérant que Bax est nativement dans un état soluble inactif et qu'aucun partenaire n'est *a priori* requis pour la maintenir dans cet état. Il est par ailleurs nécessaire d'induire des changements de conformation de Bax, par exemple par des mutations, ou que certains partenaires soient présents pour que Bax soit adressée vers la mitochondrie. La mutation de la proline 168 qui maintient l'hélice  $\alpha 9$  dans le sillon hydrophobe formé des domaines BH1–3 entraîne par exemple l'adressage vers la mitochondrie et l'activation de Bax (Arokium *et al.*, 2004; Cartron *et al.*, 2005). La mutation de la sérine 184 en alanine entraîne également une localisation constitutive de Bax dans le compartiment mitochondrial, cependant cette mutation semble bloquer Bax dans une conformation intermédiaire puisque la perméabilisation induite par ce mutant reste limitée.

Nous avons pu mettre en évidence, plusieurs facteurs modulant l'étape d'adressage vers la mitochondrie. Tout d'abord nous avons montré que Bcl-x<sub>L</sub> n'inhibe pas l'adressage de Bax. À l'inverse, en présence de Bcl-x<sub>L</sub> des variants non mitochondriaux de Bax sont relocalisés vers la mitochondrie. C'est par exemple le cas de Bax native et du mutant S184D. Cette observation semble en accord avec la localisation physiologique mitochondriale de Bcl-x<sub>L</sub> (Kaufmann *et al.*, 2003).

Nous avons ensuite caractérisé le rôle des kinases Akt et GSK-3 $\beta$ . Les deux kinases favorisent l'étape d'adressage de Bax vers la mitochondrie. Leur mécanisme d'action est toutefois différent. Akt induit un changement de conformation complet de Bax qui conduit aussi bien à son adressage qu'à son activation. Cette activation semble *a priori* contradictoire avec la fonction antiapoptotique classique d'Akt. Il faut toutefois garder à l'esprit que notre approche permet de mettre en évidence des étapes isolées des mécanismes d'activation de Bax. Il paraît probable que d'autres partenaires de Bax interviennent après ce changement de conformation et puissent l'inhiber. GSK-3 $\beta$  semble favoriser des changements de conformation plus discrets de Bax. Elle permet par exemple l'adressage de Bax native mais cette dernière reste inactive une fois mitochondriale. GSK-3 $\beta$  favorise en revanche l'adressage et l'activation complète d'un mutant « pré-activé » ayant des prédispositions à changer de conformation mais stabilisé dans une conformation inactive, le mutant P168A/S60A. Cette observation soutient l'hypothèse selon laquelle plusieurs changements de conformation de Bax sont nécessaires à son activation complète.

L'étape d'activation réelle de Bax – c'est à dire l'étape qui permet de passer d'une conformation mitochondriale à une conformation permettant la libération du cytochrome c – est plus difficile à mettre en évidence. Le mutant S184A est par exemple bloqué dans une conformation mitochondriale peu active ; toutefois le mécanisme à l'origine de ce blocage reste indéterminé d'un point de vue moléculaire.

La libération des deux extrémités de Bax semble une étape inévitable de son activation. L'interaction avec Akt et la phosphorylation de Bax sur la sérine 184 paraissent contrôler la libération de la partie C-terminale de Bax. Le mouvement de la partie C-terminale semble obligatoire à l'accessibilité des

---

domaines enfouis au cœur de la protéine. Les hélices  $\alpha 5$  et  $\alpha 6$  sont par exemple inaccessibles dans la conformation fermée de Bax. Ces hélices sont les candidates principales pour l'insertion de Bax dans la membrane mitochondriale et la formation du pore et semblent intervenir dans l'activation de Bax une fois la protéine adressée à la mitochondrie (Cartron *et al.*, 2005). De même le domaine BH3 est en partie masqué par l'hélice  $\alpha 9$  empêchant l'interaction de Bax avec ses partenaires et pourrait également inhiber son homo-dimérisation. Le mouvement de la partie N-terminale de Bax contrôle la libération de l'hélice  $\alpha 1$  impliquée dans la reconnaissance de partenaires mitochondriaux tels que TOM22 (Bellot *et al.*, 2007) l'adressage de Bax vers la mitochondries (Cartron *et al.*, 2003) mais également l'interaction avec des partenaires (Cartron *et al.*, 2004; Gavathiotis *et al.*, 2008). Le rôle de la phosphorylation de la sérine 163 dans la mobilité de la partie N-terminale pourrait passer par une modulation de l'interaction entre les résidus R9 et D154 (Arokium *et al.*, 2007) ce qui serait en accord avec les résultat obtenus en exprimant Bax et GSK-3 $\beta$  dans la levure.

## **La mitochondrie, une plateforme de contrôle de l'activation de Bax par les kinases ?**

Bax native est cytosolique et dans une conformation inactive. L'activation de Bax est contrôlée par plusieurs étapes distinctes. Nous avons montré que l'adressage de Bax n'est pas suffisant à son activation complète et à la libération du cytochrome c. Nos résultats on montré que les kinases Akt, GSK-3 $\beta$  ainsi que la protéine antiapoptotique Bcl-x<sub>L</sub> ont une localisation en partie mitochondriale et qu'elles favorisent la présence de Bax dans ce compartiment. Le basculement de Bax dans une conformation active et capable d'entraîner la libération du cytochrome c n'est en revanche pas corrélée avec cette localisation mitochondriale. Ainsi la kinase GSK-3 $\beta$  favorise l'adressage de Bax native mais cette dernière reste inactive. De même la coexpression de Bcl-x<sub>L</sub> avec le mutant actif S184D entraîne son adressage vers la mitochondrie en même temps que son inhibition. Enfin l'observation que la protéine kinase Akt entraîne une changement de conformation activateur de Bax chez *Saccharomyces cerevisiae* suggère que d'autres facteurs soient requis au niveau de la membrane mitochondriale pour conduire à son inactivation.

Le fait que l'adressage de Bax vers la mitochondrie ne soit pas corrélé à son activation et puisse même être associé à son inhibition fait apparaître la mitochondrie comme une plateforme de contrôle. Un premier ensemble de signaux serait alors à l'origine de l'adressage de Bax vers la membrane mitochondriale où elle serait prise en charge par différents partenaires. Des facteurs activateurs tels que tBid (Desagher *et al.*, 1999; Eskes *et al.*, 2000), Myc (Soucie *et al.*, 2001) ou plus récemment la kinase p38MAPK (Owens *et al.*, 2009) pourraient participer à l'activation de Bax une fois celle-ci mitochondriale. Des facteurs tels que Bcl-x<sub>L</sub> pourraient participer à l'inhibition de Bax au niveau de la membrane. Enfin des facteurs tels que la phosphorylation par Akt auraient un double rôle selon les partenaires de Bax présents. En plaçant Bax dans une conformation ouverte, elle rend possible son activation en permettant la libération des domaines impliqués dans la perméabilisation de la membrane externe ou son inhibition dans le cas où des partenaires antiapoptotiques seraient disponibles pour interagir avec elle.

Les résultats obtenus avec Bcl-x<sub>L</sub>  $\Delta C$  complètent cette hypothèse en suggérant que Bax puisse subir une activation indirecte. Nous avons montré que le variant Bcl-x<sub>L</sub>  $\Delta C$  n'interagit plus que transitoire-

ment avec Bax. De ce fait il n'est plus capable de promouvoir l'inhibition d'un variant actif de Bax. La coexpression de Bcl-x<sub>L</sub> ΔC et de Bax native révèle un comportement intrigant. L'interaction transitoire entre Bcl-x<sub>L</sub> ΔC et Bax native est suffisante à entraîner l'activation de Bax. Ces données sont soutenues par l'observation que des molécules déstabilisant l'interaction entre Bax et Bcl-x<sub>L</sub> entraînent l'activation de Bax *in vitro* et dans la levure (données non publiées)

L'hypothèse d'un contrôle de Bax au niveau de la membrane mitochondriale implique un double avantage dans la régulation de son activation. Tout d'abord le fait que Bax puisse être régulée à des étapes tardives de son activation apporte une possibilité supplémentaire de contrôle de la perméabilisation mitochondriale. Ce contrôle peut être vu comme un mécanisme de sécurité empêchant le déclenchement de l'apoptose dès lors que Bax est adressée vers la mitochondrie.

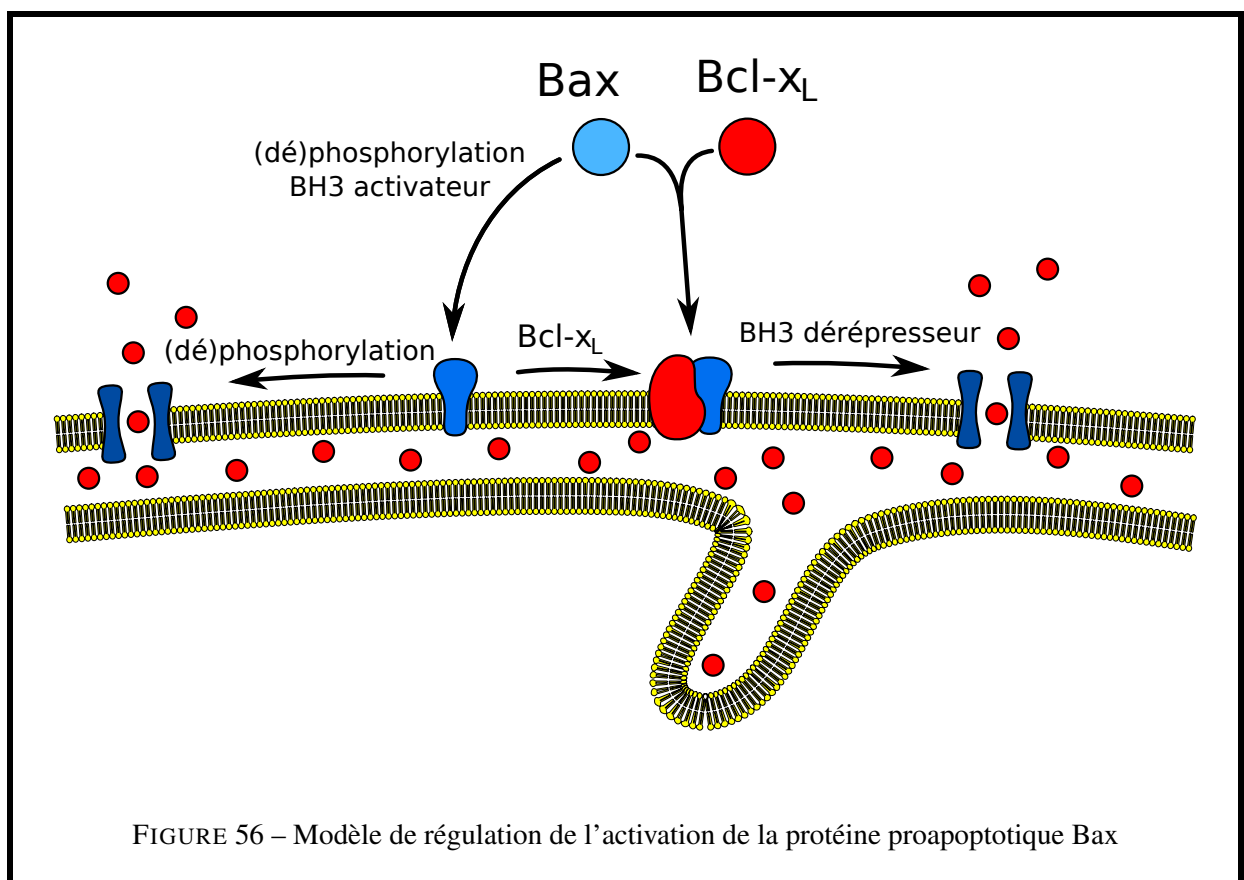
Le contrôle de chacune des étapes de l'activation de Bax permet également de sensibiliser à différents degrés la cellule au déclenchement de l'apoptose. En maintenant Bax bloquée à différents degrés d'activation, la cellule pourrait se trouver dans un état pré-activé, prêt au déclenchement de l'apoptose. L'expression de protéines telles que les protéines à BH3-seulement dérépresseur ou l'activation de kinases/phosphatases pourrait alors constituer un signal suffisant à l'activation de Bax.

Récemment des données indiquant que la mitochondrie prend une part importante dans les étapes d'activation des protéines de la famille Bcl-2 ont été apportées grâce à un modèle d'étude du syndrome de Barth. Il a été montré que les cardiolipides jouent un rôle crucial dans le recrutement de Bid et de la caspase 8 puis dans l'activation de Bid au niveau de la membrane mitochondriale. Le remplacement des cardiolipides par des phosphatidylcholines ou des phosphatidyléthanolamines abolit l'activité de la caspase 8, le recrutement et l'activation de Bid suggérant que la mitochondrie sert de plateforme d'activation de Bid. (Gonzalvez *et al.*, 2008)

## **Modèle du contrôle mitochondrial de l'activation de Bax**

Bax native est cytosolique et inactive. Son adressage vers la mitochondrie peut être favorisé par l'interaction avec un partenaire mitochondrial (par exemple la protéine antiapoptotique Bcl-x<sub>L</sub> ou des protéines à BH3-seulement activatrices) ou par un changement de conformation dû à une modification post traductionnelle (par exemple par phosphorylation).

Une fois mitochondriale, Bax peut nécessiter une activation supplémentaire, telle qu'une phosphorylation sur un second site ou une déphosphorylation. Bax peut également rester inactive au niveau de la mitochondrie par une interaction avec Bcl-x<sub>L</sub>. La présence d'une protéine proapoptotique à BH3 seulement dérépresseur peut libérer Bax de l'interaction avec Bcl-x<sub>L</sub> ; elle se trouve alors dans une conformation active et peut induire la libération du cytochrome c.





# Perspectives

## Perspectives à court terme

Dans l'optique de préciser les mécanismes de régulation de Bax par les kinases Akt et GSK-3 $\beta$  nous envisageons de caractériser la phosphorylation de Bax. À l'heure actuelle, ni l'utilisation d'un anticorps antiphosphosérine ni l'utilisation d'une phosphatase afin d'étudier le profil de migration après électrophorèse n'ont donné de résultats probants qui permettraient de quantifier la proportion de Bax phosphorylée. Des méthodes plus appropriées telles que la mesure du rapport  $^{32}\text{P}/^{35}\text{S}$  après marquage des cellules ou la spectrométrie de masse permettront de mieux caractériser les résidus mis en jeu et d'obtenir des données quantitatives sur la proportion de Bax phosphorylée.

L'utilisation de mutants inactifs d'Akt et GSK-3 $\beta$  permettra de définir si l'adressage de Bax vers la mitochondrie est dépendant de l'activité kinase ou si les kinases peuvent favoriser la localisation mitochondriale de Bax en agissant comme un récepteur. Si l'activité kinase n'est pas requise, Bax devrait être adressée de façon identique en présence des mutants inactivés d'Akt et de GSK-3 $\beta$ .

La fonction inhibitrice de Bcl-x<sub>L</sub> sur les mutants actifs de Bax reste à caractériser. L'utilisation du mutant Bcl-x<sub>L</sub> A221R devrait apporter des informations sur le rôle de localisation mitochondriale de Bcl-x<sub>L</sub>. L'étape de l'activation de Bax sur laquelle intervient Bcl-x<sub>L</sub> doit également être déterminée. Nous avons vu que Bcl-x<sub>L</sub> n'empêche pas l'adressage de Bax et ne semble pas perturber son insertion dans la membrane mitochondriale. Il serait judicieux d'étudier l'implication de Bcl-x<sub>L</sub> dans l'oligomérisation de Bax dans notre système d'étude.

L'hypothèse de l'activation indirecte de Bax *via* l'interaction avec Bcl-x<sub>L</sub> devra être approfondie en étudiant l'effet de la protéine à BH3-seulement Bad qui n'interagit pas avec Bax mais seulement avec Bcl-x<sub>L</sub>. Dans le cas où Bcl-x<sub>L</sub> favoriserait un changement de conformation de Bax tout en la maintenant piégée, l'expression de Bad devrait entraîner l'activation de Bax et la libération du cytochrome c.

## Perspectives à long terme

L'étude de la phosphorylation de Bax devra être poursuivie afin de caractériser le rôle éventuel des autres résidus phosphorylables de Bax. La sérine 60 est par exemple présente dans un site consensus (KKLS) de phosphorylation par la kinase PKA. L'implication de kinases autres qu'Akt et GSK-3 $\beta$  (p38MAPK, PKA, PKC...) ainsi que de phosphatases (PP2A) sera également à étudier. Nous avons mis en évidence que le processus d'activation de Bax comporte plusieurs étapes de régulation. La connais-

sance des mécanismes de contrôle de l'activation de Bax par ces différents acteurs permettra de préciser la chronologie des événements intervenant au cours de ce processus d'activation.

De même, les données obtenues en utilisant la protéine antiapoptotique Bcl-x<sub>L</sub> pourraient être étendues par l'étude du rôle d'autres protéines antiapoptotiques de la famille Bcl-2. La protéine Bcl-w, par exemple, possède des partenaires relativement similaires à ceux de Bcl-x<sub>L</sub> mais sa localisation cellulaire est principalement cytosolique. La comparaison des effets de ces deux protéines sur Bax dans la levure permettrait de mieux comprendre l'influence de la localisation cellulaire des différents partenaires de Bax.

La purification de la forme native et des différents mutants de Bax permettrait de compléter les approches réalisées jusqu'ici. Il est envisagé de pouvoir étudier *in vitro* l'interaction entre Bax et ses partenaires pour obtenir des données quantitatives telles que les constantes d'affinité entre les protéines. La purification de Bax sera également nécessaire à la réalisation de tests d'activation de Bax *in vitro*. La caractérisation du rôle de l'interaction entre Bax et Bcl-x<sub>L</sub> pourra par exemple être effectuée sur mitochondries isolées ou sur des liposomes. Cette approche permettra d'utiliser différents mutants des protéines, de déterminer l'effet de drogues ou de protéines inhibitrices de l'interaction Bax/Bcl-x<sub>L</sub> en disposant d'un moyen simple de reconstituer les différentes étapes temporelles de l'activation de Bax.

Jusqu'à présent, notre étude de l'activation de Bax s'est focalisée sur les étapes précoces du mécanisme. Nous avons déterminé que le rôle antiapoptotique de Bcl-x<sub>L</sub> intervient dans des étapes plus tardives de l'activation de Bax. Il est donc possible que Bcl-x<sub>L</sub> ait un effet sur l'oligomérisation de Bax ou directement sur le contrôle du canal formé par Bax. Ces hypothèses devront être testées en utilisant une souche de levure coexprimant Bax et Bcl-x<sub>L</sub>.

Dix ans après l'obtention de la structure de la forme soluble et inactive de Bax, un des grands défis restant à relever est la détermination de la structure d'une forme active ou d'un intermédiaire d'activation de Bax. Ces données permettraient d'apporter une réponse à un grand nombre d'interrogations qui subsistent sur l'activation de Bax. Elle permettrait dans un premier temps d'avoir une idée de l'étendue des changements conformationnels intervenant lors du passage de la forme globulaire et soluble à une forme dépliée et membranaire. Cette information permettrait d'apporter des données supplémentaires facilitant la compréhension des étapes clés de la régulation de l'activation de Bax. Elle permettrait dans un second temps de mieux comprendre les caractéristiques structurales du canal formé par Bax et sa régulation.

L'obtention de cette structure fait face à de nombreuses contraintes expérimentales. La forme soluble de Bax est stabilisée par le repliement de la protéine. Dans cette conformation les extrémités de Bax, en particulier la partie N-terminale, sont déjà très mobiles. C'est une des raisons qui a conduit à l'obtention d'une structure par RMN en solution plutôt que par cristallisation de la protéine et diffraction des rayons X. Dans sa conformation active, Bax est membranaire et oligomérique, ce qui crée un niveau de complexité supplémentaire. La purification et la cristallisation des protéines membranaires est un travail relativement délicat et passe notamment par l'utilisation de détergents.

La structure de mutants actifs tels que le mutant P168A devrait apporter des informations sur la conformation active de Bax. Les structures des mutants S184A ou S184D pourront être intéressantes afin de déterminer la conformation d'intermédiaires d'activation de Bax. Enfin il est envisageable de copurifier et de cristalliser Bax et Bcl-x<sub>L</sub>. Cette approche permettrait de disposer d'une conformation

---

stabilisée du complexe Bax/Bcl-x<sub>L</sub> dont la purification pourrait être facilitée dans le cas où le complexe serait plus soluble que les protéines dans une conformation membranaire. Elle permettrait en même temps de mieux comprendre comment les protéines interagissent et de mettre en évidence les modifications conformationnelles engendrées par une telle interaction.



**Quatrième partie**

**Matériels et Méthodes**



# Biologie moléculaire

## Sommaire

|     |                                                                    |            |
|-----|--------------------------------------------------------------------|------------|
| 1   | Souche bactérienne utilisée . . . . .                              | <b>153</b> |
| 2   | Plasmides et séquences utilisés . . . . .                          | <b>153</b> |
| 3   | Amplification des acides nucléiques par polymérase (PCR) . . . . . | <b>154</b> |
| 3.1 | Amplification sur levures entières . . . . .                       | 154        |
| 3.2 | Amplification sur ADN génomique . . . . .                          | 155        |
| 4   | Analyse des séquences nucléotidiques . . . . .                     | <b>156</b> |
| 4.1 | Électrophorèse sur gel d'agarose . . . . .                         | 156        |
| 4.2 | Quantification des fragments d'ADN . . . . .                       | 156        |
| 4.3 | Séquençage des acides nucléiques . . . . .                         | 156        |
| 5   | Extraction et purification des séquences nucléotidiques . . . . .  | <b>157</b> |
| 5.1 | Extraction et purification de plasmides par Miniprep . . . . .     | 157        |
| 5.2 | Purification de produits PCR sur colonne de silice . . . . .       | 158        |
| 5.3 | Isolement et purification de fragments sur gel d'agarose . . . . . | 158        |
| 6   | Digestion et ligation des séquences nucléotidiques . . . . .       | <b>158</b> |
| 6.1 | Digestion . . . . .                                                | 158        |
| 6.2 | Ligation . . . . .                                                 | 158        |
| 7   | Mutagenèse dirigée . . . . .                                       | <b>158</b> |
| 8   | Méthodes de transformation . . . . .                               | <b>160</b> |
| 8.1 | Transformation des bactéries . . . . .                             | 160        |
| 8.2 | Transformation des levures . . . . .                               | 160        |

## 1 Souche bactérienne utilisée

Les plasmides sont amplifiés dans la souche d'*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  [F',  $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15,  $\Delta$ (lacZYA, argFU169), deoR, recA1, endA1, hsdR17 (r<sub>K</sub><sup>+</sup>m<sub>K</sub><sup>+</sup>), supE44,  $\lambda^-$  thi-1, gyrA96, relA1]

## 2 Plasmides et séquences utilisés

Plusieurs plasmides ont été utilisés pour l'expression de Bax dans la levure. Tous peuvent être amplifiés par *E.Coli*, la sélection est réalisée grâce à un gène de résistance à l'ampicilline intégré aux plasmides.

L'expression des protéines clonées dans les plasmides pYes2, pYes3 et pESC-His est régulée par un promoteur inductible par le galactose.

L'expression des protéines clonées dans le plasmide pCM189 est régulée par un promoteur inductible inhibé par la tétracycline et son homologue la doxycycline.

Les séquences intégrées dans ces plasmides sont celles des ADN complémentaires humains codant pour Bax et Bcl-x<sub>L</sub>. La séquence de Bax a été recodée pour éliminer le biais dû aux fréquences d'utilisation différentes des codons entre l'homme et la levure. Ainsi les codons CGC et CGG (Arginine) très peu utilisés par la levure (< 6 %) ont été substitués par le codon AGA.

| plasmide | Gène intégré           |        | Sites de restriction |      |
|----------|------------------------|--------|----------------------|------|
|          | nom                    | taille | 5'                   | 3'   |
| pYes3    | Bax                    | 579 pb | EcoRI                | PmeI |
| pCM189   | Bcl-x <sub>L</sub> cmc | 744 pb | NotI                 | PstI |
| pYes2    | Bcl-x <sub>L</sub> cmc | 744 pb | EcoRI                | XhoI |
| pESC-His | Bad-BH3                | 48 pb  | NotI                 | ClaI |

### 3 Amplification des acides nucléiques par polymérase (PCR)

L'amplification par polymérase d'un fragment d'ADN (PCR, Polymerase Chain Reaction) est une technique couramment utilisée pour le clonage, la mutagenèse, le séquençage, la vérification d'une construction.

Le principe de cette amplification est basé sur l'utilisation des ADN polymérases de bactéries thermophiles telles que *Thermus aquaticus* (Taq polymérase) ou *Pyrococcus furiosus* (Pfu polymérase) résistantes à la chaleur (95°C) et dont la température optimale d'activité est située entre 75°C et 80°C.

Une réaction d'amplification par polymérase se déroule en trois étapes.

L'étape de dénaturation est réalisée pendant 30 à 45 s à 95°C. Elle permet de séparer les deux brins de l'ADN matrice en rompant les liaisons hydrogènes qui stabilisent la molécule.

L'étape d'hybridation réalisée pendant 30 s à 1 min à la température d'hybridation des oligonucléotides (50 à 60°C) permet leur fixation et l'amorçage de la réaction.

L'étape d'élongation, réalisée à 72°C, correspond à l'amplification du fragment d'intérêt. Cette étape dure 1 min pour 1000 pb de fragment à amplifier.

Ces trois étapes sont répétées entre 15 et 35 fois selon le but de l'amplification. La quantité de matériel synthétisé double à chaque cycle.

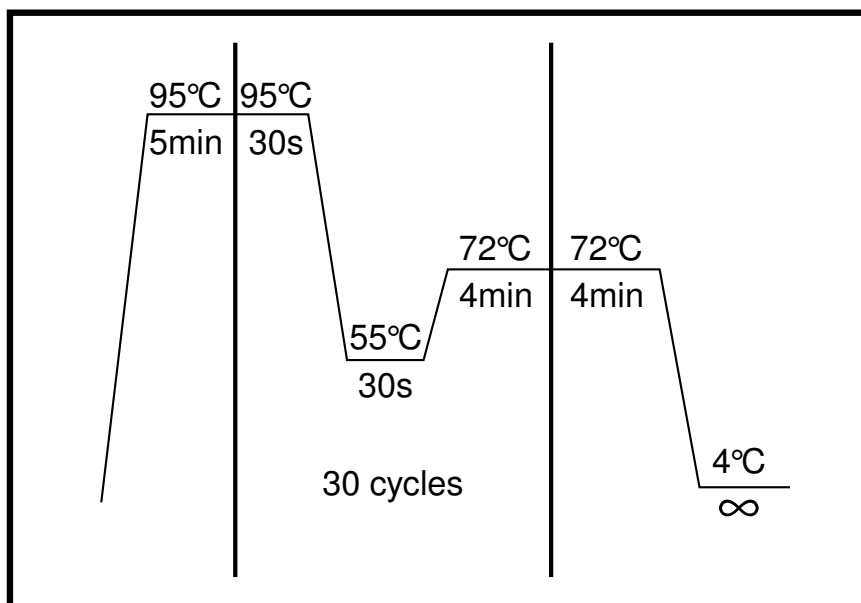
#### 3.1 Amplification sur levures entières

L'amplification d'un fragment en prenant comme matrice un lysat cellulaire permet de vérifier une construction rapidement à partir d'un prélèvement sur une colonie.

Des cellules sont prélevées avec un cure-dent stérile, reprises dans 20 µL de NaOH 20 mM et incubées à 100°C pendant 5 min puis dans la glace. 2 µL de ce lysat servent de matrice pour l'amplification dans un mélange contenant :

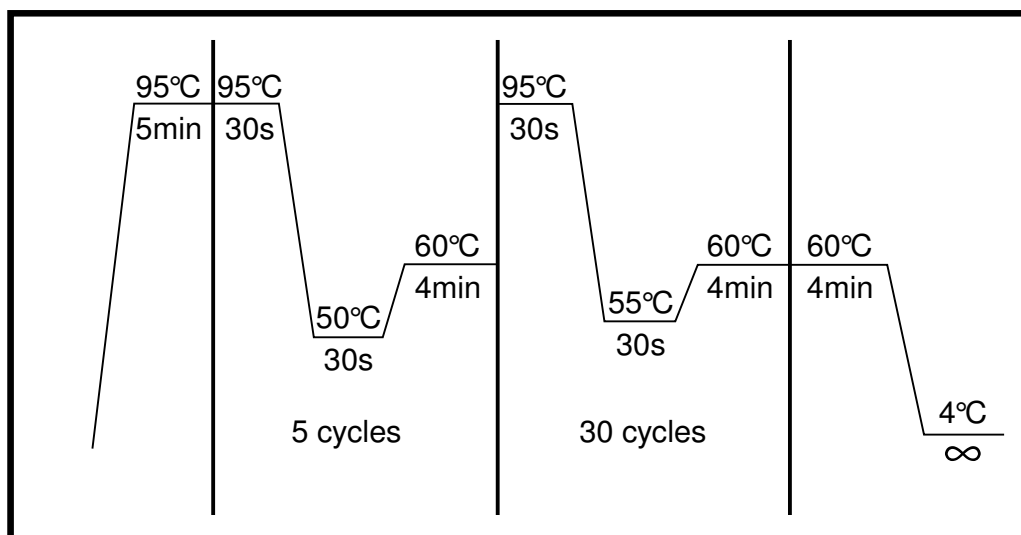
- 3  $\mu\text{L}$  de tampon de PCR 10x (Stratagène)
- 0,7  $\mu\text{L}$  de dNTP à 10 mM
- 0,5  $\mu\text{L}$  de chaque oligonucléotide à 10  $\mu\text{M}$
- 0,5  $\mu\text{L}$  d'ADN polymérase Pfu à 3 U/ $\mu\text{L}$  (Stratagène)
- 22,8  $\mu\text{L}$  d' $\text{H}_2\text{O}$  qualité biomol

Le programme thermique utilisé est le suivant :



### 3.2 Amplification sur ADN génomique

Le mélange utilisé est le même que précédemment mais le programme thermique comporte deux cycles de températures dont le premier a une température d'hybridation plus basse. Ce premier cycle permet d'assurer la synthèse du fragment d'intérêt au risque d'amplifier des fragments non désirés qui ne seront pas sélectionnés lors du deuxième cycle.



## 4 Analyse des séquences nucléotidiques

### 4.1 Électrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse de fragments d'ADN permet de les séparer et de les identifier selon leur taille. Des échantillons sont déposés dans les puits d'un gel d'agarose et un courant permet de faire migrer les molécules d'ADN - qui en milieu basique sont chargées négativement - vers l'anode (+).

Selon la taille des fragments d'intérêt, le gel d'agarose est composé de 0,8 %w/v (grands fragments) à 2 %w/v d'agarose (petits fragments) dans un tampon TBE 1x (Tris 89 mM, acide borique 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0). Le mélange porté à ébullition solidifie en refroidissant. L'incorporation de Bromure d'Éthidium (BET) ou de Gel Red<sup>TM</sup> dans le gel avant solidification permet de visualiser les fragments d'ADN. En effet, ces molécules sont des agents intercalants de l'ADN et sont fluorescents aux UV (312 nm) lorsqu'ils y sont fixés.

Les échantillons sont mélangés à un tampon de charge 2x (SDS 0,5 %w/v, Glycérol 25 %w/v, EDTA 12 mM, Bleu de Bromophénol) qui permet d'augmenter leur densité et de suivre la progression de la migration. Le gel est placé dans un bain de TBE 1x sous une tension de 100V. Un mélange commercial de fragments d'ADN standards (1 kb DNA Ladder, Euromedex) est déposé en parallèle afin d'identifier la taille et de quantifier les fragments séparés par l'électrophorèse.

### 4.2 Quantification des fragments d'ADN

#### 4.2.1 Quantification sur gel d'agarose

Lors d'une migration sur gel d'agarose en présence de BET, le nombre de molécules de BET fixées étant proportionnel à la taille d'un fragment, l'intensité de fluorescence permet de le quantifier par comparaison avec l'intensité de fluorescence d'un fragment dont la quantité déposée est connue (tel qu'un fragment d'une échelle de poids moléculaires)

#### 4.2.2 Quantification par spectrophotométrie

Les acides nucléiques peuvent être quantifiés en mesurant l'absorbance à 260 nm. Maximal à cette longueur d'onde, le coefficient d'extinction molaire est de  $0,020 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  pour l'ADN double brin ( $0,027 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  pour l'ADN simple brin et pour l'ARN) soit une concentration de 50  $\mu\text{g/mL}$  pour une unité d'absorbance. Une mesure de l'absorbance à 230 et 280 nm permet de déterminer la pureté de l'échantillon. Les rapports  $\frac{A_{260}}{A_{280}}$  et  $\frac{A_{260}}{A_{230}}$  se situent à 2 lorsque l'échantillon est composé uniquement d'acides nucléiques.

### 4.3 Séquençage des acides nucléiques

Les contructions et gènes utilisés sont séquencés pour vérifier l'intégrité de la séquence. Les fragments sont purifiés sur colonne ou par précipitation. La méthode utilise des terminateurs nucléotidiques fluorescents. Le principe consiste à effectuer une PCR en présence de ddNTP fluorescents qui stoppent l'amplification de manière aléatoire tout en marquant le fragment au point d'arrêt selon le dernier nucléotide incorporé (un fluorochrome de couleur différente pour chaque base azotée). Une chromatographie en

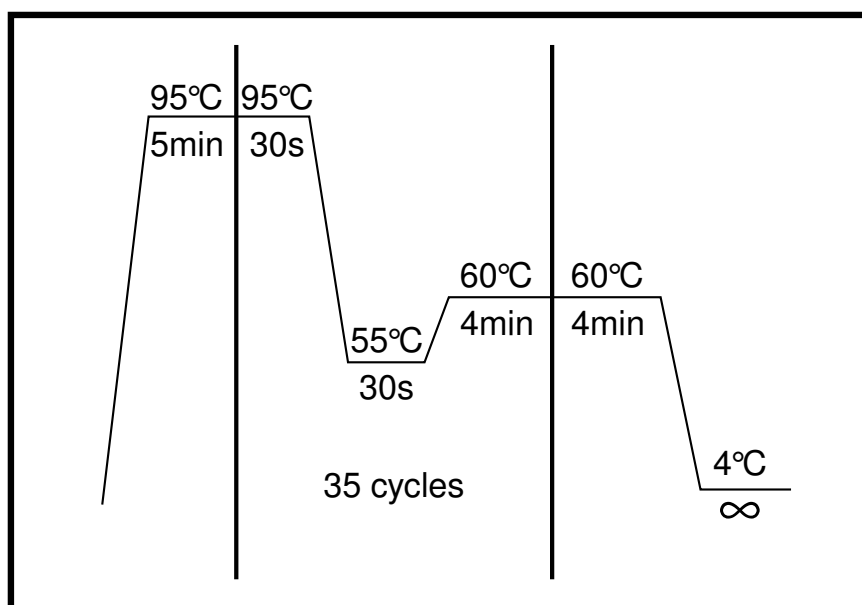
phase liquide permet de séparer les fragments issus de la réaction PCR selon leur taille qui est proportionnelle à la durée d'amplification avant incorporation d'un ddNTP marqué. La lecture de la fluorescence au fur et à mesure de la chromatographie permet de déterminer la séquence nucléotidique.

Les acides nucléiques doivent être très propres pour la réaction de séquençage. Lors du séquençage d'ADN génomique une première PCR est réalisée pour amplifier le fragment d'intérêt.

Le mélange réactionnel est composé de :

- 1 µg d'ADN matrice
- 2 µL de mélange BDT 5x (Applied Biosystems)
- 2 µL de tampon 5x (Applied Biosystems)
- 1 µL d'oligonucléotide à 10 µM
- qsp 20 µL H<sub>2</sub>O biomol

Le programme thermique utilisé est le suivant :



## 5 Extraction et purification des séquences nucléotidiques

Les échantillons ADN peuvent être extraits et purifiés par plusieurs méthodes.

### 5.1 Extraction et purification de plasmides par Miniprep

L'extraction et la purification de plasmides de bactéries est réalisée avec un kit commercial (QiaPrep Miniprep, Qiagen, ou GeneJet, Fermentas). Le principe consiste en une lyse bactérienne suivie d'une précipitation des protéines et de l'ADN génomique et d'une purification des plasmides sur une colonne de silice. Cette méthode rapide permet d'obtenir de bons rendements d'extraction et une qualité de purification supérieure à une extraction classique au Phénol/Chloroforme.

## 5.2 Purification de produits PCR sur colonne de silice

Afin d'éliminer les composants indésirables après PCR (oligonucléotides, dNTP, sels, enzyme), une purification sur colonne de silice peut être réalisée avec un kit commercial (QiaQuick PCR Purification Kit, Qiagen)

## 5.3 Isolement et purification de fragments sur gel d'agarose

Afin de séparer des fragments de différentes tailles après digestion, le produit de digestion est déposé sur gel d'agarose. Lorsque la migration est suffisante pour pouvoir parfaitement isoler le fragment d'intérêt, le gel est découpé avec une lame de scalpel. L'isolat de gel est solubilisé dans un tampon et traité avec un kit commercial (QiaQuick Gel Extraction Kit, Qiagen, ou GeneJet, Fermentas) utilisant une colonne de silice de façon analogue à la purification précédente.

# 6 Digestion et ligation des séquences nucléotidiques

## 6.1 Digestion

Afin de préparer des fragments ou des plasmides pour une ligation ou pour vérifier des constructions, il est nécessaire de les digérer avec des enzymes de restriction.

Selon les enzymes, un tampon de digestion commercial adapté est utilisé. La réaction est effectuée à 37°C pendant 1h (vérification de construction) à 3h (digestion complète) dans 50 µL avec environ 25 Unités d'enzyme pour 1 µg d'ADN. Le produit de digestion peut être précipité pour éliminer les sels et enzymes.

## 6.2 Ligation

La ligation permet de lier covalamment des séquences nucléotidiques - telles qu'un insert dans un plasmide ouvert - si ces séquences possèdent des zones d'appariement compatibles. Une liaison phosphodiester est réalisée entre les extrémités 3' et 5' des brins appariés par une ADN ligase en présence d'ATP.

Pour la ligation d'un insert dans un plasmide, 100 ng de plasmide ouvert sont utilisés en présence d'insert à une stœchiométrie de 5 inserts pour 1 plasmide. L'enzyme utilisée est la T4 DNA Ligase (Fermentas) à 1 Unité dans 20 µL de milieu réactionnel contenant 500 µM d'ATP. La réaction est effectuée pendant 1h à température ambiante puis l'enzyme est inactivée à 70°C pendant 15 min avant transformation des bactéries pour éliminer son effet toxique.

# 7 Mutagenèse dirigée

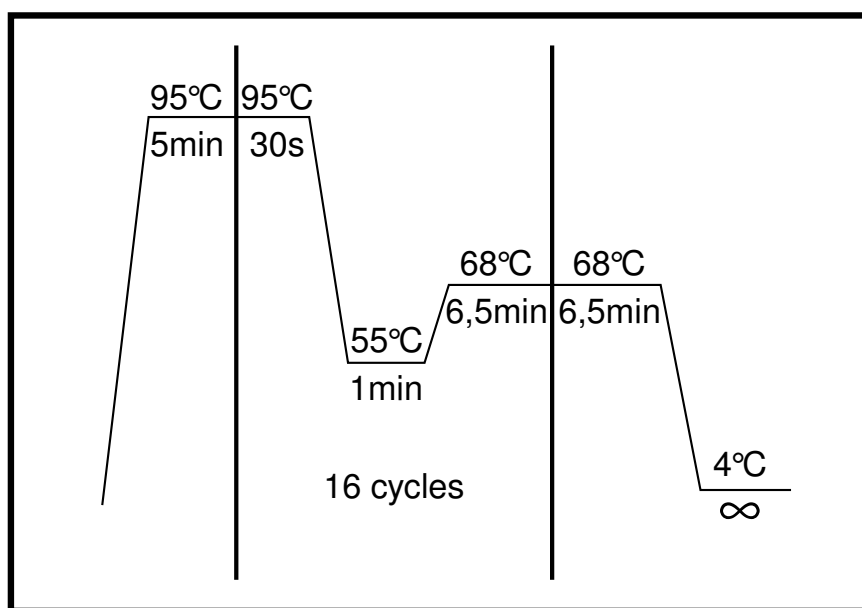
Les mutants ponctuels de Bax et de Bcl-x<sub>L</sub> ont été réalisés par mutagenèse dirigée. La méthode QuickChange développée par la société Stratagène a été utilisée. Cette méthode permet de réaliser la mutagenèse directement sur le plasmide et ne nécessite qu'une seule réaction PCR.

Le couple d'oligonucléotides utilisé pour amorcer la réaction de polymérisation possède le(s) codon(s) mutagène(s) que l'on désire substituer. L'amplification du plasmide est réalisée par une ADN polymérase à haute fidélité.

Le mélange réactionnel comporte :

- 50 ng de plasmide matrice
- 5 µL de Tampon 10x (Stratagène)
- 1 µL de chaque oligonucléotide à 10 µM
- 1 µL de dNTP à 10 mM
- 1 µL d'ADN polymérase PfuTurbo à 2,5 U/µL (Stratagène)
- qsp 50 µL H<sub>2</sub>O biomol

Le programme thermique utilisé est le suivant :



Le nombre de cycles dépend du type de mutation et sera augmenté à 18 pour une substitution multiple, une insertion ou une suppression de codon(s)

À la fin de la réaction un mélange du plasmide matrice (plasmide méthylé par la bactérie Dam+) et du plasmide néo-synthétisé est obtenu. Le plasmide matrice méthylé ne comportant pas la mutation est digéré par l'enzyme DpnI (1 µL à 10 U/µL pour 50 µL de produit PCR) spécifique de la séquence G<sub>met</sub>ATC (23 sites sur le pYes3-BaxWT)

Des bactéries compétentes sont transformées avec ce produit de réaction et les plasmides obtenus à partir de plusieurs clones sont séquencés.

## 8 Méthodes de transformation

### 8.1 Transformation des bactéries

#### 8.1.1 Utilisant des cellules pré-compétentes

Les bactéries sont cultivées en milieu liquide à 19°C sous forte agitation jusqu'à une  $DO_{600}$  d'environ 0,5 puis incubées 10 min dans la glace. Après récolte (2700 g, 10 min, 4°C) les cellules sont reprises dans du tampon de compétence TB (PIPES 10 mM,  $CaCl_2$  15 mM, KCl 250 mM,  $MnCl_2$  55 mM, pH 6,7, filtré à 0,45  $\mu$ ) additionné de 7%v/v de DMSO, aliquotées puis conservées à -80°C.

Pour la transformation, un aliquot est décongelé dans la glace. Après une incubation 40 min à 4°C en présence de 50 ng de plasmide, les cellules subissent un choc thermique 45 s à 42°C puis 2 min dans la glace puis sont reprises dans du milieu 1h à 37°C. Après centrifugation le culot cellulaire est étalé sur une boîte contenant du milieu sélectif.

#### 8.1.2 Utilisant des cellules fraîchement compétentes

Des bactéries en phase exponentielle ( $DO_{600}$  d'environ 0,3-0,5) sont récoltées et incubées avec 50 ng de plasmide dans 200 $\mu$ L de solution de compétence TSS (PEG-6000 10%w/v,  $MgSO_4$  50 mM, DMSO 5%v/v, filtré à 0,2  $\mu$ ) et subissent un choc thermique 45 s à 42°C puis 2 min dans la glace. Après ajout d'1 mL de milieu et croissance 1h à 37°C, les cellules sont récoltées et étalées sur une boîte contenant du milieu sélectif.

### 8.2 Transformation des levures

Les levures sont ensemencées le matin à une  $DO_{550}$  de 0,1 et mises en croissance pendant 4h à 28°C (20 mL de culture par transformation). Après récolte et un premier lavage à l'eau, les cellules sont lavées dans du tampon LiAc-TE (Acétate de lithium 0,1 M, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) puis reprises dans 100  $\mu$ L de ce tampon auquel sont ajoutés 100 à 200 ng de plasmide, 10  $\mu$ L d'ADN Carrier (ADN de sperme de saumon dénaturé) et 600  $\mu$ L de tampon LiAc-TE-PEG (Acétate de lithium 0,1 M, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, PEG 50 %w/v, pH 8,0).

Les cellules subissent un choc thermique 15 min à 42°C puis 10 min dans la glace et sont étalées sur une boîte contenant du milieu sélectif.

Pour effectuer une recombinaison homologue, les levures sont transformées selon le même protocole avec 100 ng du fragment d'intérêt incluant un gène de résistance à la kanamycine/généticine et sont incubées pendant 1h à 28°C dans du milieu complet avant étalement sur milieu sélectif.

# Biologie Cellulaire

## Sommaire

|     |                                         |     |
|-----|-----------------------------------------|-----|
| 1   | Souche de levure utilisée . . . . .     | 161 |
| 2   | Milieux de culture . . . . .            | 161 |
| 2.1 | Bactéries . . . . .                     | 161 |
| 2.2 | Levures . . . . .                       | 162 |
| 3   | Culture des levures . . . . .           | 162 |
| 4   | Préparation des mitochondries . . . . . | 163 |

## 1 Souche de levure utilisée

La souche de *Saccharomyces cerevisiae* principalement utilisée est la W303-1B auxotrophe pour l'adénine, l'uracile, le tryptophane, la leucine et l'histidine.

W303-1B MAT $\alpha$ , ade2, his3, leu2, trp1, ura3

Les souches sont conservées à -80°C dans du milieu de culture contenant 50% de glycérol.

## 2 Milieux de culture

### 2.1 Bactéries

Les bactéries sont cultivées en LB sous agitation à 37°C. La composition du milieu est la suivante :

- Yeast Extract 1%
- Bacto Tryptone 1,6%
- NaCl 1%
- agar 1,5% (pour un milieu solide)
- ampicilline (100 µg/mL pour un milieu sélectif)

(Les pourcentages sont donnés en masse par volume)

## 2.2 Levures

Les souches de levures peuvent être cultivées dans un milieu complet si elle n'intègrent aucun plasmide ou minimum si elle intègrent un ou plusieurs plasmides.

Les milieux primaires utilisés sont le milieu complet YPD et le milieu minimum YNB. Ces milieux primaires sont fermentatifs en raison de l'utilisation du glucose comme source de carbone et sont utilisés pour la reprise de culture à la sortie du congélateur ou pour la sélection de clones après transformation.

Des milieux secondaires, dans lesquels la source de carbone n'est pas du glucose mais de l'acide lactique, sont utilisés pour réaliser une croissance en condition respiratoire. En effet le glucose est un répresseur de l'expression des gènes impliqués dans la respiration mitochondriale. De plus l'acide lactique est oxydé en pyruvate par deux lactates déshydrogénases (Cyb2p et Dld1p) de la membrane mitochondriale externe qui cèdent leurs électrons directement au cytochrome c puis à la cytochrome c oxydase. Dans ces conditions de culture strictement respiratoires, la biogenèse mitochondriale est stimulée et les mitochondries sont parfaitement différenciées.

### 2.2.1 Milieux complets YPD/YPLactate

- Yeast Extract 1% (10 g/L)
- Bacto Peptone 1% (10 g/L)
- Glucose/Lactate 2% (20 g/L)
- Agar 2,5% (25 g/L) pour un milieu solide

(Les pourcentages sont donnés en masse par volume)

### 2.2.2 Milieux minimum YNB Glucose/Lactate

- Yeast Nitrogen Base Wo (Becton, Dickinson) 0,175% (1,75 g/L)
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,5% (5 g/L)
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1% (1 g/L)
- Drop Mix (A, R, N, D, C, E, Q, G, I, M, F, P, S, T, Y, V) 0,2% (2 g/L)
- Glucose/Lactate 2% (20 g/L)
- Marqueurs d'auxotrophie (Adé, Ura, H, L, K, W) 100 mg/L
- Agar 2% (20 g/L) pour un milieu solide

(Les pourcentages sont donnés en masse par volume)

## 3 Culture des levures

Les levures sontensemencées à partir d'une boîte ou d'un tube stocké au congélateur dans 2 à 4 mL de milieu glucose (YPD ou YNB-Glucose) pour que les cellules puissent reprendre une activité physiologique. La croissance est suivie par mesure de l'absorbance à 550 nm. Quand les cellules sont en phase exponentielle, elle sontensemencées dans une pré-culture de milieu lactate dans un volume de 4 à 5 mL (pour les extraits totaux, les immunoprécipitations) ou de 50 à 100 mL (pour une préparation de

mitochondries). Lorsque la phase exponentielle est atteinte les cellules sont ensemencées à une  $DO_{550}$  de 0,5 à 1 dans un milieu lactate.

Afin d'induire l'expression des gènes sous contrôle du promoteur GAL1 (inductible au galactose) qui sont portés par les plasmides pYes2, pYes3 ou pESC-His, 1,25%v/v d'une solution de galactose à 40%(w/v) est ajouté au milieu de culture (concentration finale de 0,5%v/v). La culture est poursuivie pendant 4 à 12h, le maximum d'expression étant atteint à partir de 6h.

## 4 Préparation des mitochondries

Des levures cultivées en milieu lactate sont récoltées en milieu de phase exponentielle ( $DO_{550}$  entre 4 et 6). La première étape consiste à fragiliser la paroi par une incubation pendant 15 min dans un tampon réducteur ( $\beta$ -mercaptoéthanol 0,5 M, Tris 0,1 M, pH 9,3) à raison de 10 mL de tampon par gramme de levure sèche (0,5 g<sub>MS</sub> par litre de culture à 1  $DO_{550}$ ).

Après deux lavages dans un tampon Tris/KCl (Tris 10 mM, KCl 0,5 M, pH 7), la seconde étape permet la digestion de la paroi dans 10 mL/g<sub>MS</sub> d'un tampon de digestion (Sorbitol 1,35 M, acide citrique 10 mM, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 30 mM, EGTA 1 mM, pH 5,8) contenant 0,1 mg/mL de zymolyase 20T (Seikagaku corp.) ( $\beta$ -1,3-glucan laminaripentaohydrolase d'*Arthrobacter luteus*) une enzyme dégradant les polymères de glucose de la paroi. La digestion dure entre 30 et 45 min et est suivie par microscopie. Les cellules digérées apparaissent grises, circulaires et éclatent en milieu hypo-osmotique : ce sont des sphéropastes.

Les sphéropastes sont récoltés par centrifugation à 7700 g, homogénéisés au potter dans un tampon de lavage iso-osmotique pour les cellules (Sorbitol 0,750 M, Mannitol 0,4 M, Tris Maléate 10 mM, BSA 0,1%w/v, pH 6,8) afin d'éliminer la zymolyase.

Ce lavage est réalisé deux fois.

Les sphéropastes sont récoltés et repris dans un tampon hypo-osmotique pour les cellules et iso-osmotique pour les mitochondries (Mannitol 0,6 M, BSA 0,2%w/v, Tris-Maléate 10 mM, pH 6,8). La suspension est mixée au Waring Blendor 2 fois 5 secondes.

L'homogénat est centrifugé à 500 g pendant 10 min pour éliminer les débris cellulaires, le surnageant est centrifugé à 17000 g pendant 10 min pour récolter les mitochondries. Le culot de débris peut être homogénéisé une seconde fois pour récolter plus de mitochondries.

La fraction mitochondriale est reprise au potter dans un tampon de récupération (Mannitol 0,6 M, EGTA 2 mM, Tris-Maléate 10 mM, pH 6,8) et les étapes précédentes sont répétées pour augmenter sa pureté.

Les mitochondries sont reprises dans le tampon de récupération (auquel peuvent être rajoutés des inhibiteurs de protéases) et la concentration protéique est déterminée par un dosage de Lowry.



# Biochimie

## Sommaire

|     |                                                                                           |            |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 1   | Préparation des extraits protéiques . . . . .                                             | <b>165</b> |
| 1.1 | Dosage des protéines (Méthode de Lowry) . . . . .                                         | 165        |
| 1.2 | Extraits sur cellules entières . . . . .                                                  | 166        |
| 1.3 | Extraits protéiques mitochondriaux . . . . .                                              | 166        |
| 1.4 | Traitement des mitochondries pour déterminer le degré d'insertion des protéines . . . . . | 166        |
| 1.5 | Immunoprécipitation des protéines . . . . .                                               | 167        |
| 2   | Analyse des protéines . . . . .                                                           | <b>167</b> |
| 2.1 | Quantification des cytochromes par spectrophotométrie . . . . .                           | 167        |
| 2.2 | Électrophorèse des protéines par SDS-PAGE . . . . .                                       | 168        |
| 2.3 | Immunodétection des protéines sur membrane . . . . .                                      | 169        |

## 1 Préparation des extraits protéiques

### 1.1 Dosage des protéines (Méthode de Lowry)

Les protéines sont quantifiées par la méthode de Lowry qui permet un dosage pour des concentrations protéiques allant de 5 à 50 µg/mL. Le principe du dosage consiste en l'oxydation, en milieu alcalin, des liaisons peptidiques et des acides aminés polaires (tryptophane, tyrosine) par les ions  $\text{Cu}^{2+}$  de la solution de dosage. Les ions  $\text{Cu}^+$  produits par la réaction sont dosés par le réactif de Folin-Ciocalteu (phosphomolybdate et phosphotungstate) qui les réoxyde en  $\text{Cu}^{2+}$  et vire du jaune au bleu. La mesure de l'absorbance à 750 nm permet de détecter la formation du réactif réduit et donc la quantité de protéines.

Les extraits protéiques (dilués) à doser sont solubilisés dans 50 µL (volume final) d'une solution de SDS 5%w/v. Après addition de 750 µL de solution A (tartrate de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  0,02%w/v,  $\text{CuSO}_4$  0,01%w/v,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  4%w/v, NaOH 0,1N) et une incubation de 5 min à 37°C, 75 µL de réactif de Folin-Ciocalteu sont ajoutés et le mélange est incubé une seconde fois 5 min à 37°C. L'absorbance est mesurée à 750 nm et une gamme étalon réalisée en parallèle avec des quantités connues d'Albumine de Sérum Bovin permet de déterminer les concentrations en protéines des échantillons. La loi de Beer-Lambert permet de relier de façon proportionnelle la concentration protéique à l'absorbance.

$$A_{700} = \epsilon_{700} \cdot c \cdot l$$

$A_{700}$  : absorbance à 700 nm,  $\epsilon$  : absorptivité molaire ( $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ ),

$c$  : concentration, ( $mol \cdot L^{-1}$ ),  $l$  : longueur du trajet optique( $cm$ )

## 1.2 Extraits sur cellules entières

2 mL d'une culture à une  $DO_{550}$  de 4 sont récoltés par centrifugation et lavés à l'eau. Le culot cellulaire est repris dans 500  $\mu L$  d'une solution de lyse ( $\beta$ -mercaptoéthanol 3,5%(v/v), NaOH 2 M) et incubé 10 min dans la glace. Les protéines sont précipitées par l'ajout de 50  $\mu L$  d'acide trichloroacétique (TCA) 3 M puis centrifugées à 16000 g pendant 5 min. Le TCA est éliminé et un lavage à l'acétone suivi d'un séchage peuvent être effectués. Les protéines sont solubilisées dans 40  $\mu L$  de SDS 5%w/v auxquels sont ajoutés 20  $\mu L$  de tampon de Laemmli 3x (glycérol 60%w/v, SDS 6%w/v, Tris-HCl 150 mM à pH 6,8,  $\beta$ -mercaptoéthanol 6%v/v, bleu de bromophénol 0,12 %w/v). L'échantillon est porté à 70°C pendant 10 min pour solubiliser et dénaturer les protéines.

## 1.3 Extraits protéiques mitochondriaux

Un volume de mitochondries correspondant à 1 mg de protéines est solubilisé dans 1 mL d'eau. Les protéines sont précipitées par ajout de 100  $\mu L$  de TCA 3 M. Après centrifugation et élimination du TCA les culots protéiques sont lavés à l'acétone, séchés et repris dans 40  $\mu L$  de SDS 5%w/v auxquels sont ajoutés 20  $\mu L$  de tampon de Laemmli 3x. L'échantillon est porté à 70°C pendant 10 min. Le but de la précipitation est d'éliminer toute activité protéasique.

## 1.4 Traitement des mitochondries pour déterminer le degré d'insertion des protéines

Afin de déterminer si les protéines étudiées sont insérées dans la membrane mitochondriale, un traitement des mitochondries avec différentes espèces chimiques est réalisé. Pour le traitement témoin 1 mg (protéines) de mitochondries est resuspendu dans une solution d'HEPES à 10 mM (pH 7,2). L'ajout de 10%v/v de  $Na_2CO_3$  1 M (pH 10) permet de décrocher les protéines de la fraction mitochondriale ayant uniquement une interaction électrostatique avec la membrane. L'ajout de 1%v/v de Triton-X100 permet de solubiliser la majorité des protéines membranaires.

Les échantillons sont ensuite centrifugés à 4°C pendant 15 min à 50000 g. Le surnageant contenant les protéines décrochées est transféré dans un tube neuf et le culot de mitochondries est repris dans 500  $\mu L$  d'eau. Chaque fraction est additionnée de 10%v/v de TCA pour précipiter les protéines. Après centrifugation les protéines sont solubilisées dans 40  $\mu L$  de SDS 5%w/v auxquels sont ajoutés 20  $\mu L$  de tampon de Laemmli 3x. Les échantillons sont incubés à 70°C pendant 10 min.

## 1.5 Immunoprécipitation des protéines

La technique d'immunoprécipitation permet de purifier une protéine grâce à un anticorps spécifique. Elle peut être utilisée pour mettre en évidence l'interaction entre deux protéines en immunoprécipitant l'une et en détectant la seconde par immunodétection.

L'immunoprécipitation peut être réalisée sur des extraits cellulaires (les cellules sont cassées au vortex grâce à des billes de verre) ou sur des extraits mitochondriaux. Les protéines sont solubilisées en conditions non dénaturantes pendant 1h à 4°C par l'ajout de tampon d'immunoprécipitation 10x (IP buffer, Sigma) contenant un détergent non-ionique (CHAPS ou NP40) puis 1 à 2 µg d'anticorps sont ajoutés pendant la nuit. Les complexes protéines/anticorps sont ensuite précipités par l'ajout (pendant 6h) de billes d'agarose couplées à de la protéine G, celle-ci étant capable de fixer les IgG.

Ces incubations sont réalisées dans des tubes comportant un embout pourvu d'un filtre en silice, ce qui permet par la suite de laver les billes avec du tampon d'immunoprécipitation en l'éliminant à chaque fois par centrifugation. Les protéines immunoprécipitées sont éluées par l'ajout de tampon de Laemmli et un chauffage de l'échantillon à 70°C pendant 10 min entraînant la rupture des interactions entre protéine G, anticorps et protéines immunoprécipitées. L'utilisation ou non de β-mercaptoéthanol dans le tampon d'éluion permet respectivement de casser ou de garder intacts les ponts disulfures assemblant les chaînes lourdes et légères constituant les anticorps. Il sera ainsi possible de s'affranchir de la présence d'une bande aspécifique migrant à la taille des protéines d'intérêt si celles-ci sont d'une taille voisine de celle des chaînes des anticorps.

## 2 Analyse des protéines

### 2.1 Quantification des cytochromes par spectrophotométrie

Étant donné la présence d'un hème à noyau fer et la forte conjugaison du groupement aromatique porphyrine de l'hème, les cytochromes peuvent se trouver dans deux états d'oxydation. Quand les cytochromes sont oxydés le fer est à l'état  $\text{Fe}^{3+}$  et lorsqu'ils sont réduits il est à l'état  $\text{Fe}^{2+}$ . Ces deux formes absorbent la lumière avec un coefficient d'extinction molaire différent.

La réalisation du différentiel entre les spectres d'absorbance des cytochromes en conditions oxydante et réductrice permet de quantifier les cytochromes c+c1, b et a+a3 dont les pics d'absorbance se situent respectivement à 550, 561 et 603 nm. Trois points isobestes à 540, 575 et 630 nm permettent de définir une absorbance de référence à partir de laquelle seront calculées ces valeurs.

Le rapport de la quantité de cytochromes c+c1 et de cytochrome b permet de quantifier la libération spécifique du cytochrome c. En effet, le cytochrome b n'étant pas libéré lors de la perméabilisation induite par Bax, il sert d'étalon interne de la quantité totale de cytochromes.

On peut ainsi calculer le rapport  $\frac{[\text{cytochrome c}]}{[\text{cytochrome b}]} = \frac{A_{550} - A_{540}}{A_{561} - A_{575}}$ , estimateur de la libération du cytochrome c. Le cytochrome c1 n'étant pas libéré et ayant une stœchiométrie de 1 avec le cytochrome b, il est possible de déterminer la proportion de cytochrome c libérée. Une valeur de 2 correspond à une absence de libération du cytochrome c, une valeur de 1,5 à une libération forte et une valeur de 1 à une libération quasi-totale.

Il arrive qu'il y ait un écart d'absorbance entre les points isobestes ( $\delta = A_{575} - A_{540}$ ). Le rapport des cytochromes est surestimé lorsque l'écart est positif et sous-estimé dans le cas inverse. L'erreur obtenue pour chaque cytochrome étant proportionnelle à l'écart d'absorbance, une correction est appliquée permettant d'obtenir un rapport non biaisé :

$$\frac{[\text{cytochrome c}]_{\text{corr.}}}{[\text{cytochrome b}]_{\text{corr.}}} = \frac{(A_{550} - A_{540}) - \frac{10}{35} \cdot \delta}{(A_{561} - A_{575}) + \frac{14}{35} \cdot \delta}$$

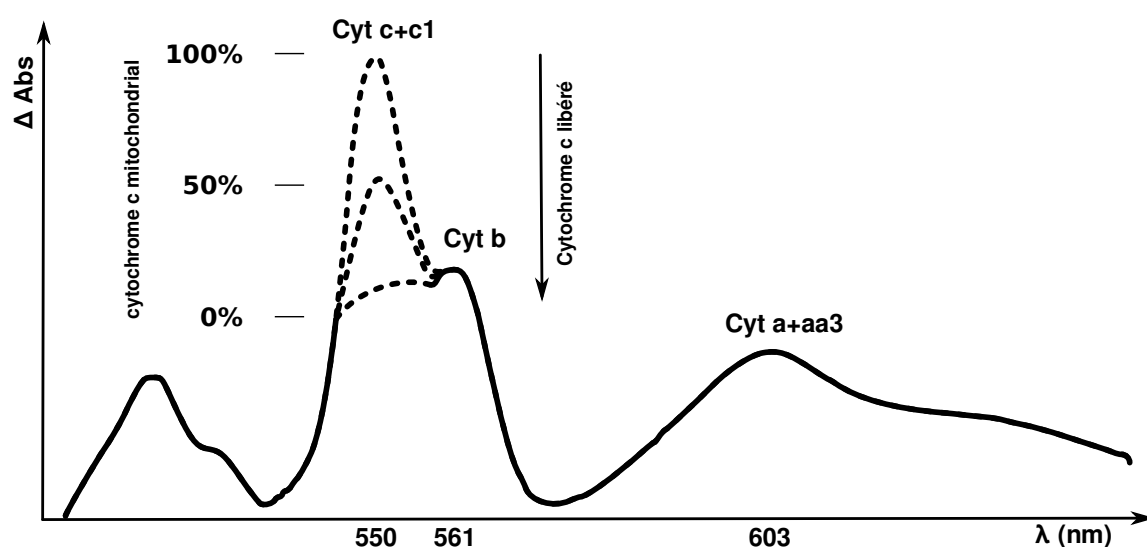


FIGURE 57 – Spectre d'oxydoréduction des cytochromes mitochondriaux

## 2.2 Électrophorèse des protéines par SDS-PAGE

L'électrophorèse des protéines sur gel de polyacrylamide en présence de SDS permet de les séparer en fonction de leur masse en présence d'un courant électrique.

Le SDS est un détergent et surfactant anionique dénaturant les protéines et leur apportant une charge globale négative. La quantité de SDS fixée sur les protéines est proportionnelle à leur masse, à raison de 1,4 g de SDS fixé par gramme de protéines. Ainsi, la charge de la protéine est directement dépendante de sa masse qui devient alors le critère principal de séparation.

Les échantillons protéiques sont solubilisés dans du tampon de charge Laemmli. Ce tampon est dénaturant en raison du SDS et du  $\beta$ -mercaptoéthanol qui le composent. Le  $\beta$ -mercaptoéthanol permet la réduction des ponts disulfures au sein des chaînes ou complexes protéiques. Le glycérol aide au dépôt des échantillons dans les puits du gel en augmentant sa densité.

L'électrophorèse est réalisée sur un gel de polyacrylamide. Les protéines sont déposées dans les puits d'un gel de concentration (acrylamide 5% w/v, bisacrylamide 0,13% w/v, Tris-HCl 125 mM pH 6,7, SDS 0,1% w/v, TEMED 0,1% v/v, persulfate d'ammonium 0,05% w/v) dont le rôle est d'augmenter la résolu-

tion. Un second gel fait suite au gel de concentration et permet la séparation des protéines (acrylamide 10 à 15%w/v, bisacrylamide 0,25 à 0,4%w/v, Tris-HCl 375 mM pH 8,8, SDS 0,1%w/v, glycérol 15%w/v, TEMED 0,1%v/v, persulfate d'ammonium 0,05%w/v). Ce gel de séparation a une concentration de polyacrylamide comprise entre 10 et 15% selon la masse des protéines devant être identifiée (une plus grande concentration diminue la maille du gel et favorise la séparation des protéines de faible masse).

La migration des protéines est effectuée dans un tampon de migration (SDS 0,15%w/v, glycine 2,5%w/v, Tris 0,6%w/v, pH 8,8) en présence d'un courant électrique de 300V avec une intensité de 20mA par gel.

### 2.3 Immunodétection des protéines sur membrane

Après migration d'un gel d'électrophorèse, les protéines peuvent être transférées sur une membrane de nitrocellulose ou de polyfluorure de vinylidène (PVDF). Ces matières fixent les protéines grâce à des interactions ioniques et hydrophobes. Le transfert est réalisé grâce à un appareil de transfert en condition semi-sèche. L'appareil est composé de deux électrodes métalliques entre lesquelles un courant d'intensité 10mA par cm<sup>2</sup> de surface de membrane fait migrer pendant 1h les protéines du gel à la membrane.

Le courant est transmis grâce à des feuilles de papier Whatman disposées de part et d'autre du gel et de la membrane et imbibées d'un tampon de transfert (SDS 0,1%w/v, glycine 0,44%w/v, Tris 0,3%w/v, éthanol 20%v/v).

Après transfert, la membrane est séchée, rincée dans un tampon PBS-tween (NaCl 140 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, tween20 0,2%w/v, pH 7,2). Elle est ensuite saturée par un tampon PBS-tween contenant 5%w/v de lait écrémé. Cette étape permet de combler toutes les zones de la membrane susceptibles de fixer des protéines, notamment lors des étapes suivantes où seront utilisés des anticorps.

Un premier anticorps spécifique de la protéine d'intérêt ou d'un épitope caractéristique est mis en solution dans le lait pendant 1h à 37°C ou la nuit à 4°C. Après une étape de rinçage dans du PBS-tween, un second anticorps, spécifique des IgG de l'espèce animale ayant servi à la production des anticorps primaires, est ajouté dans le bain de PBS-tween pendant 1h à température ambiante. Cet anticorps est couplé à la peroxydase de raifort. Après 6 étapes de rinçage dans du PBS-tween la membrane est mise au contact d'une solution commerciale (ECL+, Amersham) permettant la révélation des zones où se sont fixés les anticorps. La peroxydase oxyde, en présence de peroxyde d'hydrogène, le dérivé du luminol contenu dans l'ECL+. Lors de la réaction un intermédiaire instable est formé dont la décomposition est accompagnée de l'émission d'un photon sous forme de lumière bleue.

Le signal lumineux est enregistré par une caméra (GeneGnome) ou sur un film photographique (Amersham). Le film permet une détection du signal avec une meilleure sensibilité mais non linéairement, les cristaux composant le film atteignant rapidement le maximum d'impression. La caméra permet une acquisition linéaire des signaux plus forts.



---

# Bioinformatique

## Sommaire

---

|     |                                           |            |
|-----|-------------------------------------------|------------|
| 1   | Bases de données biologiques . . . . .    | <b>171</b> |
| 1.1 | Séquences nucléotidiques . . . . .        | 171        |
| 1.2 | Séquences et données protéiques . . . . . | 171        |
| 1.3 | Données structurales . . . . .            | 172        |
| 2   | Manipulation des séquences . . . . .      | <b>172</b> |
| 2.1 | Alignements de séquences . . . . .        | 172        |
| 2.2 | Automatisation des tâches . . . . .       | 172        |
| 3   | Traitement des signaux . . . . .          | <b>172</b> |
| 3.1 | Traitement des images . . . . .           | 172        |

---

## 1 Bases de données biologiques

### 1.1 Séquences nucléotidiques

Les séquences nucléotidiques sont obtenues à partir de la base de données GenBank (National Center for Biotechnology Information, États-Unis) faisant partie du projet International Nucleotide Sequence Database Collaboration. Cette base de données est accessible par le web à l'adresse [www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)

Les séquences des gènes de la levure *Saccharomyces cerevisiae* sont présentes dans la base de données Saccharomyces Genome Database (SGD) disponible à l'adresse [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)

### 1.2 Séquences et données protéiques

La base de données de séquence protéiques UniProtKB est gérée par le consortium UniProt. Ce dernier regroupe les bases de données SwissProt (Swiss Institute of Bioinformatics), TrEMBL (European Bioinformatics Institute) et PIR (Georgetown University Medical Center). Cette base constitue une source d'informations importante tant au niveau des séquences que des références bibliographiques ou des annotations qui les accompagnent. Les données sont accessibles à l'adresse [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)

### 1.3 Données structurales

La base de données Protein Data Bank (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB), PDB Europe, PDB Japan) comporte des informations sur les structures de nombreuses protéines. Différents outils de recherche et de visualisation ainsi que les données expérimentales structurales sont disponibles sur le site du RCSB à l'adresse [www.rcsb.org/pdb/](http://www.rcsb.org/pdb/)

## 2 Manipulation des séquences

### 2.1 Alignements de séquences

Les alignements des séquences nucléotidiques théoriques et obtenues lors du séquençage de constructions permettent de vérifier la présence de mutations, l'insertion ou l'intégrité de fragments. Les alignements sont obtenus grâce au logiciel `bl2seq` du projet BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) développé par le NCBI (National Center for Biotechnology Information, États-Unis). Ce logiciel et les algorithmes d'alignements le composant font partie du domaine public.

### 2.2 Automatisation des tâches

L'automatisation des tâches de traduction, de recherche de séquences ou de codons rares est réalisée grâce à des scripts programmés en `bash` et en `Python`. `Python` est un langage multi-paradigmes de haut niveau ce qui le rend relativement simple à mettre en œuvre. `Python` est particulièrement adapté à la manipulation de données textuelles et plus généralement à un usage scientifique (notamment grâce à de nombreuses bibliothèques standard). `Python` est multiplateforme et distribué sous une licence libre permissive, la Python Software Foundation License. `Bash` est un langage de script shell également multiplateforme dont l'interpréteur de commandes est distribué sous la licence libre GNU GPL.

## 3 Traitement des signaux

### 3.1 Traitement des images

#### 3.1.1 Quantification des bandes sur gel ou film

Les films et photographies sont numérisés et traités grâce au logiciel `ImageJ` développé par le NIH (National Institutes of Health, États-Unis). Ce logiciel multiplateforme est écrit en `Java`, ce qui rend simple la programmation de greffons ou l'écriture de macros. Ainsi de nombreux outils basés sur `ImageJ` sont développés par la communauté scientifique. Le code de ce logiciel est ouvert et fait partie du domaine public.

La quantification des niveaux de gris des pixels et leur sommation sur un axe permet de déterminer un profil d'intensité dont les pics ont une aire proportionnelle à l'intensité des bandes détectée par la caméra ou sur le film. Cette approche est semi-quantitative en raison des différentes étapes pouvant donner un signal non linéaire (fixation des anticorps, saturation du film...).

Pour une quantification réelle, une gamme doit être réalisée dans des conditions identiques.

### 3.1.2 Compilation des images de microscopie de fluorescence

Les images obtenues par microscopie de fluorescence sont en niveau de gris généralement avec une profondeur de 16 bits. Les images couleur sont composées de plusieurs couches d'information correspondant dans le cas présent au modèle de couleur RVB comportant un canal pour chaque composante de couleur (rouge, vert, bleu). Le modèle de couleur RVB est un modèle additif, ainsi la superposition de deux composantes de couleur génère une troisième couleur dite complémentaire (par exemple jaune pour une superposition des canaux rouges et verts). Cette propriété permet d'obtenir, à partir des acquisitions au microscope, des images en fausses couleurs indiquant une superposition des signaux lorsque des teintes complémentaires sont produites. Les données de microscopie étant acquises indépendamment pour les différents fluorochromes il est possible de reconstituer une images en fausses couleurs en définissant arbitrairement pour chaque canal les données brutes en niveau de gris d'une des acquisitions. En pratique les canaux sont choisis afin de respecter le type de teinte du fluorochrome (canal vert pour la GFP par exemple) mais ne correspondent pas aux couleurs réelles émises par le fluorochrome.

# Table des matières

|          |                                                                               |           |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>I</b> | <b>Introduction</b>                                                           | <b>3</b>  |
| <b>1</b> | <b>Morts cellulaires</b>                                                      | <b>5</b>  |
| 1        | Pourquoi les cellules meurent-elles ? . . . . .                               | 5         |
| 1.1      | Rôle lors du développement . . . . .                                          | 7         |
| 1.2      | Maintien de l'homéostasie . . . . .                                           | 8         |
| 1.3      | Réponse à un stress . . . . .                                                 | 9         |
| 2        | Principaux phénotypes et morphologies de morts cellulaires . . . . .          | 9         |
| 2.1      | L'apoptose . . . . .                                                          | 9         |
| 2.2      | La mort avec autophagie . . . . .                                             | 11        |
| 2.2.1    | L'autophagie, un programme de survie cellulaire . . . . .                     | 11        |
| 2.2.2    | L'autophagie et la mort cellulaire . . . . .                                  | 11        |
| 2.3      | La nécrose . . . . .                                                          | 12        |
| 2.4      | Autres formes de morts cellulaires . . . . .                                  | 13        |
| 3        | Implications pathologiques d'une dérégulation des morts cellulaires . . . . . | 14        |
| <b>2</b> | <b>Mécanismes moléculaires des morts cellulaires</b>                          | <b>15</b> |
| 1        | Mécanismes moléculaires de la nécrose . . . . .                               | 15        |
| 1.1      | Signaux inducteurs de la nécrose . . . . .                                    | 16        |
| 1.1.1    | Agents chimiques . . . . .                                                    | 16        |
| 1.1.2    | Agents physiques . . . . .                                                    | 16        |
| 1.1.3    | Agents pathogènes . . . . .                                                   | 16        |
| 1.1.4    | Conditions cellulaires extrêmes . . . . .                                     | 16        |
| 1.1.5    | Conditions physiologiques . . . . .                                           | 17        |
| 1.2      | Acteurs et mécanismes moléculaires . . . . .                                  | 17        |
| 1.2.1    | Protéases impliquées dans l'exécution de la nécrose . . . . .                 | 17        |
| 1.2.1.1  | Les calpaïnes, des protéases dépendantes du calcium . . . . .                 | 17        |
| 1.2.1.2  | Les cathepsines lysosomales . . . . .                                         | 18        |
| 1.2.2    | Mécanismes généraux . . . . .                                                 | 18        |
| 2        | Mécanismes moléculaires de l'apoptose . . . . .                               | 18        |
| 2.1      | L'apoptose chez <i>Caenorhabditis elegans</i> . . . . .                       | 18        |
| 2.2      | L'apoptose chez les mammifères . . . . .                                      | 20        |
| 2.2.1    | Signaux inducteurs . . . . .                                                  | 20        |
| 2.2.1.1  | Signaux extracellulaires . . . . .                                            | 20        |
| 2.2.1.2  | Signaux intracellulaires . . . . .                                            | 24        |
| 2.2.2    | Les caspases : des protéases aux fonctions variées . . . . .                  | 26        |
| 2.2.2.1  | Éléments structuraux . . . . .                                                | 26        |

|          |                                                                                 |           |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.2.2.2  | Principales fonctions des caspases impliquées dans l'apoptose . . . . .         | 28        |
| 2.2.2.3  | Cascade d'activation des caspases . . . . .                                     | 28        |
| 2.2.3    | Exécution de l'apoptose et point de non-retour . . . . .                        | 29        |
| <b>3</b> | <b>La mitochondrie, organe central de la voie intrinsèque de l'apoptose</b>     | <b>33</b> |
| 1        | Organisation des mitochondries et principales fonctions cellulaires . . . . .   | 33        |
| 1.1      | Structure . . . . .                                                             | 33        |
| 1.2      | Fonctions mitochondriales non apoptotiques . . . . .                            | 34        |
| 1.2.1    | Production d'énergie par les oxydations phosphorylantes . . . . .               | 34        |
| 1.2.2    | La mitochondrie et le calcium . . . . .                                         | 36        |
| 1.2.2.1  | Régulation de la production d'ATP . . . . .                                     | 36        |
| 1.2.2.2  | Régulation de la transition de perméabilité . . . . .                           | 36        |
| 1.3      | Mécanismes d'import des protéines mitochondriales . . . . .                     | 37        |
| 1.3.1    | Le complexe TOM : étape initiale de l'import des protéines . . . . .            | 37        |
| 1.3.2    | Le complexe TIM23 et l'adressage vers la matrice mitochondriale . . . . .       | 38        |
| 1.3.3    | Les petites protéines TIM . . . . .                                             | 38        |
| 1.3.4    | Les complexes SAM et TIM22 et l'assemblage des protéines membranaires . . . . . | 38        |
| 1.3.5    | Import des protéines liées à l'apoptose . . . . .                               | 39        |
| 1.3.5.1  | Protéines de l'espace intermembranaire . . . . .                                | 39        |
| 1.3.5.2  | Protéines de la famille Bcl-2 . . . . .                                         | 39        |
| 1.4      | Dynamique mitochondriale . . . . .                                              | 39        |
| 1.4.1    | Mécanismes de fusion mitochondriale . . . . .                                   | 40        |
| 1.4.2    | Mécanismes de fission mitochondriale . . . . .                                  | 40        |
| 1.4.3    | Mécanismes de tubulation . . . . .                                              | 41        |
| 2        | Rôle des protéines de l'espace intermembranaire dans l'apoptose . . . . .       | 41        |
| 2.1      | Le cytochrome c . . . . .                                                       | 41        |
| 2.2      | L'AIF . . . . .                                                                 | 42        |
| 2.3      | Protéines inhibitrices des IAP . . . . .                                        | 43        |
| 2.3.1    | Smac/DIABLO . . . . .                                                           | 43        |
| 2.3.2    | HtrA2/Omi . . . . .                                                             | 43        |
| 2.4      | L'endonucléase G . . . . .                                                      | 44        |
| 3        | La famille Bcl-2 et la perméabilisation de la membrane externe . . . . .        | 44        |
| 3.1      | La famille Bcl-2 . . . . .                                                      | 44        |
| 3.1.1    | Structures et fonctions au cours de l'apoptose . . . . .                        | 44        |
| 3.1.1.1  | Les membres antiapoptotiques de la famille Bcl-2 . . . . .                      | 47        |
| 3.1.1.2  | Les membres proapoptotiques à multidomaines . . . . .                           | 49        |
| 3.1.1.3  | Les membres proapoptotiques à BH3-seulement activateurs . . . . .               | 50        |
| 3.1.1.4  | Les membres proapoptotiques à BH3-seulement dérépresseurs . . . . .             | 52        |
| 3.1.2    | Régulations des membres de la famille Bcl-2 . . . . .                           | 53        |
| 3.1.2.1  | Transcriptionnelles . . . . .                                                   | 53        |
| 3.1.2.2  | Modifications post-traductionnelles . . . . .                                   | 54        |
| 3.2      | Mécanismes de perméabilisation de la membrane externe . . . . .                 | 56        |
| 3.2.1    | Le Mitochondrial Apoptosis Channel . . . . .                                    | 56        |
| 3.2.2    | Pores lipidiques . . . . .                                                      | 57        |
| <b>4</b> | <b>La protéine proapoptotique Bax</b>                                           | <b>59</b> |
| 1        | Données générales, relations structure-fonction . . . . .                       | 59        |
| 1.1      | Adressage de Bax vers la mitochondrie . . . . .                                 | 62        |
| 1.1.1    | Rétention dans le cytosol . . . . .                                             | 62        |

|         |                                                                                                                    |           |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1.1.2   | Rôle des extrémités de Bax . . . . .                                                                               | 63        |
| 1.1.2.1 | L'extrémité N-terminale possède un motif d'adressage . . . . .                                                     | 63        |
| 1.1.2.2 | L'hélice $\alpha 9$ . . . . .                                                                                      | 64        |
| 1.1.2.3 | Stabilisation et exposition des domaines terminaux . . . . .                                                       | 65        |
| 1.1.2.4 | Sensibilité de Bax à un changement de conformation . . . . .                                                       | 66        |
| 1.1.3   | Implication de récepteurs mitochondriaux . . . . .                                                                 | 66        |
| 1.2     | Insertion et oligomérisation dans la membrane externe . . . . .                                                    | 67        |
| 1.2.1   | Insertion . . . . .                                                                                                | 67        |
| 1.2.2   | Oligomérisation . . . . .                                                                                          | 68        |
| 2       | Rôle de la phosphorylation de Bax . . . . .                                                                        | 69        |
| 2.1     | La voie Akt/PKB . . . . .                                                                                          | 69        |
| 2.2     | La kinase GSK-3 $\beta$ . . . . .                                                                                  | 69        |
| 2.3     | Phosphorylation de Bax et contrôle de l'apoptose . . . . .                                                         | 71        |
| 2.3.1   | Sérine 60 . . . . .                                                                                                | 71        |
| 2.3.2   | Sérine 163 . . . . .                                                                                               | 72        |
| 2.3.3   | Thréonine 167 . . . . .                                                                                            | 72        |
| 2.3.4   | Sérine 184 . . . . .                                                                                               | 72        |
|         | <b>Objet de l'étude et stratégie mise en œuvre</b>                                                                 | <b>75</b> |
|         | <b>II Résultats</b>                                                                                                | <b>77</b> |
| 1       | <b>Caractérisation du rôle des kinases Akt et GSK-3<math>\beta</math> sur le processus d'activation de Bax</b>     | <b>79</b> |
| 1       | Introduction . . . . .                                                                                             | 79        |
| 2       | Données préliminaires . . . . .                                                                                    | 81        |
| 2.1     | Expression des protéines dans la levure . . . . .                                                                  | 81        |
| 2.2     | Mutants phosphomimétiques . . . . .                                                                                | 81        |
| 2.3     | Rôle du résidu 184 dans l'adressage de Bax, une première approche des changements de conformation de Bax . . . . . | 83        |
| 2.3.1   | Adressage vers la mitochondrie . . . . .                                                                           | 83        |
| 2.3.2   | Capacité à perméabiliser la membrane externe . . . . .                                                             | 84        |
| 2.4     | Discussion . . . . .                                                                                               | 86        |
| 3       | Étude du rôle de la protéine kinase Akt . . . . .                                                                  | 89        |
| 3.1     | Clonage d'AKT1 . . . . .                                                                                           | 89        |
| 3.2     | Expression d'Akt chez la levure . . . . .                                                                          | 90        |
| 3.3     | Adressage vers la mitochondrie et insertion membranaire . . . . .                                                  | 90        |
| 3.4     | Activation de Bax et perméabilisation de la membrane mitochondriale . . . . .                                      | 92        |
| 3.5     | Localisation d'Akt . . . . .                                                                                       | 93        |
| 3.6     | Discussion . . . . .                                                                                               | 95        |
| 4       | Étude du rôle de la protéine kinase GSK-3 $\beta$ . . . . .                                                        | 97        |
| 4.1     | Clonage et expression de GSK-3 $\beta$ chez la levure . . . . .                                                    | 97        |
| 4.2     | Effet de GSK-3 $\beta$ sur le caractère mitochondrial de Bax . . . . .                                             | 97        |
| 4.3     | Activation de Bax et perméabilisation . . . . .                                                                    | 100       |
| 4.4     | Localisation de GSK-3 $\beta$ . . . . .                                                                            | 102       |
| 4.5     | Discussion . . . . .                                                                                               | 104       |
| 5       | Caractérisation de la phosphorylation de Bax . . . . .                                                             | 106       |
| 6       | Discussion . . . . .                                                                                               | 106       |

|          |                                                                                                         |            |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>2</b> | <b>Rôle de la protéine antiapoptotique Bcl-x<sub>L</sub> sur les changements de conformation de Bax</b> | <b>111</b> |
| 1        | Introduction . . . . .                                                                                  | 111        |
| 2        | Quel est le mécanisme d'action antiapoptotique de Bcl-x <sub>L</sub> ? . . . . .                        | 112        |
| 2.1      | Rôle antiapoptotique de Bcl-x <sub>L</sub> . . . . .                                                    | 112        |
| 2.2      | Où sont localisées Bax et Bcl-x <sub>L</sub> ? . . . . .                                                | 116        |
| 2.3      | Importance de la localisation mitochondriale de Bcl-x <sub>L</sub> . . . . .                            | 119        |
| 2.4      | Discussion . . . . .                                                                                    | 123        |
| 3        | Un double rôle pour Bcl-x <sub>L</sub> ? . . . . .                                                      | 124        |
| 3.1      | Le rôle particulier de Bcl-x <sub>L</sub> ΔC . . . . .                                                  | 124        |
| 3.2      | Bad/ABT 737 . . . . .                                                                                   | 128        |
| 4        | Discussion . . . . .                                                                                    | 129        |
| <b>3</b> | <b>Mise en œuvre d'une méthode de criblage</b>                                                          | <b>133</b> |
| 1        | Problématique . . . . .                                                                                 | 133        |
| 2        | Immunofluorescence sur levures . . . . .                                                                | 134        |
| 3        | Étiquetage . . . . .                                                                                    | 134        |
| 3.1      | Étiquette tétracystéine . . . . .                                                                       | 135        |
| 3.2      | Split GFP . . . . .                                                                                     | 138        |
| 3.2.1    | Construction d'une souche comportant un cytochrome c étiqueté avec le fragment GFP 11 . . . . .         | 138        |
|          | <b>III Discussion et perspectives</b>                                                                   | <b>139</b> |
|          | <b>Discussion</b>                                                                                       | <b>141</b> |
|          | <b>Perspectives</b>                                                                                     | <b>144</b> |
|          | <b>IV Matériels et Méthodes</b>                                                                         | <b>151</b> |
| <b>1</b> | <b>Biologie moléculaire</b>                                                                             | <b>153</b> |
| 1        | Souche bactérienne utilisée . . . . .                                                                   | 153        |
| 2        | Plasmides et séquences utilisés . . . . .                                                               | 153        |
| 3        | Amplification des acides nucléiques par polymérase (PCR) . . . . .                                      | 154        |
| 3.1      | Amplification sur levures entières . . . . .                                                            | 154        |
| 3.2      | Amplification sur ADN génomique . . . . .                                                               | 155        |
| 4        | Analyse des séquences nucléotidiques . . . . .                                                          | 156        |
| 4.1      | Électrophorèse sur gel d'agarose . . . . .                                                              | 156        |
| 4.2      | Quantification des fragments d'ADN . . . . .                                                            | 156        |
| 4.2.1    | Quantification sur gel d'agarose . . . . .                                                              | 156        |
| 4.2.2    | Quantification par spectrophotométrie . . . . .                                                         | 156        |
| 4.3      | Séquençage des acides nucléiques . . . . .                                                              | 156        |
| 5        | Extraction et purification des séquences nucléotidiques . . . . .                                       | 157        |
| 5.1      | Extraction et purification de plasmides par Miniprep . . . . .                                          | 157        |
| 5.2      | Purification de produits PCR sur colonne de silice . . . . .                                            | 158        |
| 5.3      | Isolement et purification de fragments sur gel d'agarose . . . . .                                      | 158        |
| 6        | Digestion et ligation des séquences nucléotidiques . . . . .                                            | 158        |
| 6.1      | Digestion . . . . .                                                                                     | 158        |

|          |                                                                                           |            |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 6.2      | Ligation . . . . .                                                                        | 158        |
| 7        | Mutagenèse dirigée . . . . .                                                              | 158        |
| 8        | Méthodes de transformation . . . . .                                                      | 160        |
| 8.1      | Transformation des bactéries . . . . .                                                    | 160        |
| 8.1.1    | Utilisant des cellules pré-compétentes . . . . .                                          | 160        |
| 8.1.2    | Utilisant des cellules fraîchement compétentes . . . . .                                  | 160        |
| 8.2      | Transformation des levures . . . . .                                                      | 160        |
| <b>2</b> | <b>Biologie Cellulaire</b>                                                                | <b>161</b> |
| 1        | Souche de levure utilisée . . . . .                                                       | 161        |
| 2        | Milieux de culture . . . . .                                                              | 161        |
| 2.1      | Bactéries . . . . .                                                                       | 161        |
| 2.2      | Levures . . . . .                                                                         | 162        |
| 2.2.1    | Milieux complets YPD/YPLactate . . . . .                                                  | 162        |
| 2.2.2    | Milieux minimum YNB Glucose/Lactate . . . . .                                             | 162        |
| 3        | Culture des levures . . . . .                                                             | 162        |
| 4        | Préparation des mitochondries . . . . .                                                   | 163        |
| <b>3</b> | <b>Biochimie</b>                                                                          | <b>165</b> |
| 1        | Préparation des extraits protéiques . . . . .                                             | 165        |
| 1.1      | Dosage des protéines (Méthode de Lowry) . . . . .                                         | 165        |
| 1.2      | Extraits sur cellules entières . . . . .                                                  | 166        |
| 1.3      | Extraits protéiques mitochondriaux . . . . .                                              | 166        |
| 1.4      | Traitement des mitochondries pour déterminer le degré d'insertion des protéines . . . . . | 166        |
| 1.5      | Immunoprécipitation des protéines . . . . .                                               | 167        |
| 2        | Analyse des protéines . . . . .                                                           | 167        |
| 2.1      | Quantification des cytochromes par spectrophotométrie . . . . .                           | 167        |
| 2.2      | Électrophorèse des protéines par SDS-PAGE . . . . .                                       | 168        |
| 2.3      | Immunodétection des protéines sur membrane . . . . .                                      | 169        |
| <b>4</b> | <b>Bioinformatique</b>                                                                    | <b>171</b> |
| 1        | Bases de données biologiques . . . . .                                                    | 171        |
| 1.1      | Séquences nucléotidiques . . . . .                                                        | 171        |
| 1.2      | Séquences et données protéiques . . . . .                                                 | 171        |
| 1.3      | Données structurales . . . . .                                                            | 172        |
| 2        | Manipulation des séquences . . . . .                                                      | 172        |
| 2.1      | Alignements de séquences . . . . .                                                        | 172        |
| 2.2      | Automatisation des tâches . . . . .                                                       | 172        |
| 3        | Traitement des signaux . . . . .                                                          | 172        |
| 3.1      | Traitement des images . . . . .                                                           | 172        |
| 3.1.1    | Quantification des bandes sur gel ou film . . . . .                                       | 172        |
| 3.1.2    | Compilation des images de microscopie de fluorescence . . . . .                           | 173        |

|                           |            |
|---------------------------|------------|
| <b>Table des matières</b> | <b>174</b> |
| <b>Table des figures</b>  | <b>180</b> |
| <b>Nomenclature</b>       | <b>185</b> |
| <b>Index</b>              | <b>187</b> |
| <b>Bibliographie</b>      | <b>189</b> |

# Table des figures

|                                                                                                                                   |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Introduction</b>                                                                                                               | <b>5</b>  |
| 1 Coupe d'écorce observée au microscope par Robert Hooke . . . . .                                                                | 6         |
| 2 Comparaison du tissu interdigital chez la souris et la chauve-souris . . . . .                                                  | 8         |
| 3 Morphologie de cellules épithéliales lors de deux stades de l'apoptose . . . . .                                                | 10        |
| 4 Morphologie de l'autophagie chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . . . . .                                                      | 12        |
| 5 Morphologie d'une cellule nécrotique . . . . .                                                                                  | 13        |
| 6 Mécanismes impliqués dans la nécrose . . . . .                                                                                  | 19        |
| 7 Mécanismes et protéines impliqués dans l'apoptose chez <i>Caenorhabditis elegans</i> . . . . .                                  | 21        |
| 8 Signalisation du récepteur du TNF- $\alpha$ . . . . .                                                                           | 23        |
| 9 Classification des caspases . . . . .                                                                                           | 27        |
| 10 Organisation structurale de l'apoptosome . . . . .                                                                             | 29        |
| 11 Principaux mécanismes impliqués dans l'apoptose . . . . .                                                                      | 31        |
| 12 Organisation des complexes des oxydations phosphorylantes . . . . .                                                            | 35        |
| 13 Rôle des cardiolipides dans la formation des sites de contact entre les membranes mitochondriales interne et externe . . . . . | 42        |
| 14 La famille Bcl-2 . . . . .                                                                                                     | 45        |
| 15 Alignement des domaines BH3 des principaux membres de la famille Bcl-2 . . . . .                                               | 46        |
| 16 Structure primaire de Bax . . . . .                                                                                            | 60        |
| 17 Structure tertiaire de Bax . . . . .                                                                                           | 61        |
| 18 Partie N-terminale de Bax . . . . .                                                                                            | 64        |
| 19 Voies de signalisation PI3K/Akt . . . . .                                                                                      | 70        |
| 20 Localisation des sérines phosphorylables de Bax . . . . .                                                                      | 71        |
| <b>Résultats</b>                                                                                                                  | <b>79</b> |
| 21 Position de la sérine 163 dans la structure de Bax . . . . .                                                                   | 81        |
| 22 Position de l'hélice $\alpha 9$ et de la sérine 184 dans la structure de Bax . . . . .                                         | 82        |
| 23 Adressage mitochondrial des mutants de la sérine 184 de Bax . . . . .                                                          | 84        |
| 24 Capacité des mutants de la sérine 184 à entraîner la libération du cytochrome c . . . . .                                      | 86        |
| 25 Représentation schématique de la structure de Bax. . . . .                                                                     | 88        |
| 26 Expression des mutants constitutivement actifs d'Akt dans la levure . . . . .                                                  | 90        |
| 27 Adressage de Bax vers la mitochondrie en présence de la kinase Akt . . . . .                                                   | 91        |
| 28 Insertion de Bax dans la membrane mitochondriale en présence de la kinase Akt . . . . .                                        | 91        |

|                              |                                                                                                                                                      |            |
|------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 29                           | Conséquence de la présence de la kinase humaine Akt sur l'activation de Bax et la libération du cytochrome c . . . . .                               | 93         |
| 30                           | Présence de la kinase Akt dans la fraction mitochondriale . . . . .                                                                                  | 94         |
| 31                           | Colocalisation de Bax et Akt dans la fraction mitochondriale . . . . .                                                                               | 94         |
| 32                           | Expression de la kinase humaine GSK-3 $\beta$ dans la levure . . . . .                                                                               | 97         |
| 33                           | Étude du rôle de la sérine 163 par une approche phosphomimétique . . . . .                                                                           | 98         |
| 34                           | Localisation mitochondriale et insertion de différents variant de Bax en présence de la kinase humaine GSK-3 $\beta$ . . . . .                       | 99         |
| 35                           | Conséquence de la présence de la kinase humaine GSK-3 $\beta$ sur l'activation de Bax et la libération du cytochrome c . . . . .                     | 101        |
| 36                           | Localisation et insertion de GSK-3 $\beta$ dans la membrane mitochondriale . . . . .                                                                 | 102        |
| 37                           | Colocalisation de Bax et GSK-3 $\beta$ dans la fraction mitochondriale . . . . .                                                                     | 103        |
| 38                           | Comparaison des résultats obtenus sur la sérine 163 par l'approche phosphomimétique ou par l'expression de GSK-3 $\beta$ . . . . .                   | 105        |
| 39                           | Conséquence de l'expression de la protéine antiapoptotique Bcl-x <sub>L</sub> sur la libération du cytochrome c induite par Bax . . . . .            | 113        |
| 40                           | Interaction entre Bax et Bcl-x <sub>L</sub> . . . . .                                                                                                | 114        |
| 41                           | Adressage vers la mitochondrie de Bax S184D en présence de Bcl-x <sub>L</sub> . . . . .                                                              | 116        |
| 42                           | Effet de Bcl-x <sub>L</sub> sur l'adressage mitochondrial du mutant S184D et sur la libération du cytochrome c . . . . .                             | 117        |
| 43                           | Insertion de Bax dans la membrane mitochondriale en présence de Bcl-x <sub>L</sub> . . . . .                                                         | 118        |
| 44                           | Adressage vers la mitochondrie de Bcl-x <sub>L</sub> et Bcl-x <sub>L</sub> $\Delta$ C . . . . .                                                      | 119        |
| 45                           | Localisation cellulaire des mutants G217R et A221R de Bcl-x <sub>L</sub> par fractionnement cellulaire . . . . .                                     | 120        |
| 46                           | Localisation cellulaire du mutant A221R de Bcl-x <sub>L</sub> par immunofluorescence dans des cellules HeLa . . . . .                                | 121        |
| 47                           | Comparaison de l'effet de Bcl-x <sub>L</sub> , Bcl-x <sub>L</sub> $\Delta$ C et Bcl-x <sub>L</sub> A221R sur la libération du cytochrome c . . . . . | 122        |
| 48                           | Interaction entre Bax et Bcl-x <sub>L</sub> $\Delta$ C . . . . .                                                                                     | 125        |
| 49                           | Conséquence de l'expression de la protéine antiapoptotique Bcl-x <sub>L</sub> $\Delta$ C sur la libération du cytochrome c induite par Bax . . . . . | 126        |
| 50                           | Mesure de la libération du cytochrome c induite par Bax S184D en présence de Bcl-x <sub>L</sub> $\Delta$ C . . . . .                                 | 127        |
| 51                           | Caractérisation de l'effet de la rupture de l'interaction Bax/Bcl-x <sub>L</sub> sur l'état d'activation de Bax . . . . .                            | 129        |
| 52                           | Aspécificité de l'immunofluorescence anti-Bax sur levures . . . . .                                                                                  | 135        |
| 53                           | Ajout d'une étiquette au locus par recombinaison homologue. . . . .                                                                                  | 136        |
| 54                           | Mesure de la respiration de la souche exprimant un cytochrome c étiqueté tétracystéine . . . . .                                                     | 136        |
| 55                           | Spectre d'oxydoréduction des cytochromes de la souche exprimant un cytochrome c étiqueté tétracystéine . . . . .                                     | 137        |
| <b>Discussion</b>            |                                                                                                                                                      | <b>141</b> |
| 56                           | Modèle de régulation de l'activation de la protéine proapoptotique Bax . . . . .                                                                     | 145        |
| <b>Matériels et Méthodes</b> |                                                                                                                                                      | <b>153</b> |
| 57                           | Spectre d'oxydoréduction des cytochromes mitochondriaux . . . . .                                                                                    | 168        |



# Nomenclature

|                    |                                                         |
|--------------------|---------------------------------------------------------|
| A1                 | Bcl2-related protein A1 (Bcl-2-like 5)                  |
| ADN                | acide désoxyribonucléique                               |
| ADNc               | ADN complémentaire                                      |
| AIF                | apoptosis inducing factor                               |
| Apaf-1             | apoptosis protease activating factor 1                  |
| APS                | persulfate d'ammonium                                   |
| ARN                | acide ribonucléique                                     |
| ATP                | adénosine 5'-triphosphate                               |
| Bad                | Bcl-2 associated death promoter (Bcl-2-like 8)          |
| Bak                | Bcl-2 homologous antagonist killer (Bcl-2-like 7)       |
| Bax                | Bcl-2 associated X protein (Bcl-2-like 4)               |
| Bcl-2              | B cell lymphoma type 2                                  |
| Bcl-w              | Bcl-2-like 2 protein (Bcl-2-like 2)                     |
| Bcl-x <sub>L</sub> | Basal cell lymphoma extra large (Bcl-2-like 1)          |
| BET                | bromure d'ethidium                                      |
| BH                 | Bcl-2 homology domain                                   |
| Bid                | BH3 interacting domain death agonist                    |
| Bim                | Bcl-2 interacting mediator of apoptosis (Bcl-2-like 11) |
| BIR                | baculovirus IAP repeat                                  |
| Bok                | Bcl2-related ovarian killer (Bcl-2-like 9)              |
| BSA                | albumine sérique bovine                                 |
| CARD               | caspase-recruitment domain                              |
| caspase            | cystein-aspartate protease                              |
| DD                 | death domain                                            |
| DED                | death effector domain                                   |
| DIABLO             | direct IAP binding protein with a low pI (Smac)         |
| DISC               | death-inducing signaling complex                        |

|                |                                                                      |
|----------------|----------------------------------------------------------------------|
| DMSO           | diméthylsulfoxyde                                                    |
| dNTP           | désoxyribonucléotide                                                 |
| EDTA           | acide éthylènediamine tetracétique                                   |
| EGTA           | acide éthylèneglycol tetracétique                                    |
| ERK            | extracellular signal-related kinase                                  |
| FADD           | Fas associated death domain protein                                  |
| FITC           | fluorescéine isothiocyanate                                          |
| FLICE          | FADD-like ICE (caspase 8)                                            |
| GSK-3 $\beta$  | Glycogen synthase kinase 3 $\beta$                                   |
| HEPES          | acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthanesulfonique               |
| HtrA2          | high temperature requirement protein A2                              |
| IAP            | inhibitor of apoptosis                                               |
| IASD           | acide 4-acétamido-4'-((iodoacétyl) amino) stilbène-2,2'-disulfonique |
| IBM            | IAP bonding motif                                                    |
| ICE            | interleukin-converting enzyme (caspase 1)                            |
| IgG            | immunoglobuline de type G                                            |
| JNK            | Jun N-terminal kinase                                                |
| kDa            | kilodalton                                                           |
| Luminol        | 3-Aminophthalhydrazide                                               |
| MAC            | mitochondrial apoptosis-induced channel                              |
| MAPK           | mitogen-activated protein kinase                                     |
| Mcl-1          | myeloid cell leukemia sequence 1 (Bcl-2-like 3)                      |
| Mule           | Mcl-1 ubiquitin ligase E3                                            |
| NF- $\kappa$ B | nuclear factor $\kappa$ B                                            |
| Noxa           | phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1                    |
| PBS            | tampon phosphate salin (phosphate buffered saline)                   |
| PEG            | polyéthylène glycol                                                  |
| PI3K           | phosphatidylinositol-3-kinase                                        |
| PIPES          | acide pipérazine-N,N'-bis-2-éthanesulfonique                         |
| PUMA           | p53 upregulated modulator of apoptosis (Bcl-2 binding component 3)   |
| PVDF           | polyfluorure de vinylidène                                           |
| RIP            | receptor interacting protein                                         |
| SDS            | dodécylsulfate de sodium / laurysulfate de sodium                    |

SDS-PAGE Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium

Smac second mitochondrial-derived activator of caspases (DIABLO)

Sv sievert

tBid truncated Bid

TCA acide trichloroacétique

TEMED (N,N,N',N') tétra-méthyl-éthylènediamine

TNF tumour necrosis factor

TNF-R TNF receptor

TRADD TNF-R associated death domain protein

TRAIL TNF-related apoptosis-inducing ligand

Tris 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol

YNB milieu levure minimum (yeast nitrogen base)

YPD milieu levure complet peptone/dextrose (yeast peptone dextrose)



# Index

- A1, voir Bfl1
- AIF, 42
- Akt, 69, 80
- apoptose
  - mécanismes, 18
  - morphologie, 9
- autophagie
  - morphologie, 11
- Bad, 52
- Bak, 49
- Bax, 49, **59**
  - adressage, 62
  - ART, 63
  - hélice  $\alpha$ 9, 64
  - insertion membranaire, 67
  - oligomérisation, 68
  - partenaires
    - 14-3-3, 62
    - Bcl-2, 48, 62, 74
    - Bcl-w, 62
    - Bcl-x<sub>L</sub>, 62, 73, 112
    - Bfl1, 49
    - Bid, 50, 65
    - Bim, 51, 65
    - Mcl-1, 73
    - Mfn2, 40
    - p53, 24
    - PKC $\zeta$ , 73
    - Puma, 52, 65
    - TOM22, 66
    - VDAC, 66
  - phosphorylation, 69
  - sérine 184, 65, **72**, 83
- Bcl-2, 47
- Bcl-2 (famille), 44
  - domaines d'homologie, 44
  - import mitochondrial, 39
  - membres antiapoptotiques, 47
  - membres proapoptotiques
    - à BH3-seulement, 49
    - à multidomaines, 49
    - régulation, 53
- Bcl-w, 48
- Bcl-x<sub>L</sub>, **48**, **111**
- Bfl1, 48
- Bid, 28, **50**, 57, 66
- Bik, 52
- Bim, 51
- Bmf, 53
- céramides, 26, 74
- calpaïnes, 17
- cardiolipides, 25, 41, 51, 57, 144
- caspases, 26
- cathepsines, 18
- cytochrome c, 41
- endonucléase G, 44
- GSK-3 $\beta$ , 69, 80
- Hrk, 53
- HtrA2/Omi, 43
- JNK, 72
- Mcl-1, 48
- mitochondrie, 33
  - dynamique, 39
  - mécanismes d'import, 37
  - oxydations phosphorylantes, 34
- nécrose
  - mécanismes, 15
  - morphologie, 12
- Noxa, 53
- p38, 26, 72
- p53, 24

perméabilisation mitochondriale, 56

MAC, 56

pores lipidiques, 57

PTP, 36

PP2A, 74, 80

Puma, 52

récepteurs de mort, 20

Smac/DIABLO, 43

tBid, voir Bid

# Bibliographie

- Adams, J. M. et Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 26, 1324–1337.
- Adrain, C., Creagh, E. M. et Martin, S. J. (2001). Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. *EMBO J* 20, 6627–6636.
- Al-Khouri, A. M., Ma, Y., Togo, S. H., Williams, S. et Mustelin, T. (2005). Cooperative phosphorylation of the tumor suppressor phosphatase and tensin homologue (PTEN) by casein kinases and glycogen synthase kinase 3 $\beta$ . *J Biol Chem* 280, 35195–35202.
- Alessi, D. R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P. et Hemmings, B. A. (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 15, 6541–6551.
- Andoh, T., Hirata, Y. et Kikuchi, A. (2000). Yeast glycogen synthase kinase 3 is involved in protein degradation in cooperation with Bul1, Bul2, and Rsp5. *Mol Cell Biol* 20, 6712–6720.
- Annis, M. G., Soucie, E. L., Dlugosz, P. J., Cruz-Aguado, J. A., Penn, L. Z., Leber, B. et Andrews, D. W. (2005). Bax forms multispinning monomers that oligomerize to permeabilize membranes during apoptosis. *EMBO J* 24, 2096–2103.
- Antonsson, B., Montessuit, S., Lauper, S., Eskes, R. et Martinou, J. C. (2000). Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J* 345 Pt 2, 271–8.
- Antonsson, B., Montessuit, S., Sanchez, B. et Martinou, J. C. (2001). Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem* 276, 11615–11623.
- Aouacheria, A., Brunet, F. et Gouy, M. (2005). Phylogenomics of life-or-death switches in multicellular animals : Bcl-2, BH3-Only, and BNip families of apoptotic regulators. *Mol Biol Evol* 22, 2395–2416.
- Apostolova, N., Cervera, A. M., Victor, V. M., Cadenas, S., Sanjuan-Pla, A., Alvarez-Barrientos, A., Esplugues, J. V. et McCreath, K. J. (2006). Loss of apoptosis-inducing factor leads to an increase in reactive oxygen species, and an impairment of respiration that can be reversed by antioxidants. *Cell Death Differ* 13, 354–357.
- Arnoult, D., Gaume, B., Karbowski, M., Sharpe, J. C., Cecconi, F. et Youle, R. J. (2003). Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *EMBO J* 22, 4385–4399.
- Arnoult, D., Grodet, A., Lee, Y., Estaquier, J. et Blackstone, C. (2005). Release of OPA1 during apoptosis participates in the rapid and complete release of cytochrome c and subsequent mitochondrial fragmentation. *J Biol Chem* 280, 35742–35750.

- Arnoult, D., Petit, F., Lelièvre, J. et Estaquier, J. (2003). Mitochondria in HIV-1-induced apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 304, 561–574.
- Arokium, H., Camougrand, N., Vallette, F. M. et Manon, S. (2004). Studies of the interaction of substituted mutants of BAX with yeast mitochondria reveal that the C-terminal hydrophobic alpha-helix is a second ART sequence and plays a role in the interaction with anti-apoptotic BCL-xL. *J Biol Chem* 279, 52566–73.
- Arokium, H., Ouerfelli, H., Velours, G., Camougrand, N., Vallette, F. M. et Manon, S. (2007). Substitutions of potentially phosphorylatable serine residues of bax reveal how they may regulate its interaction with mitochondria. *J Biol Chem* 282, 35104–12.
- Ashford, T. P. et Porter, K. R. (1962). Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. *J Cell Biol* 12, 198–202.
- Baines, C. P., Kaiser, R. A., Purcell, N. H., Blair, N. S., Osinska, H., Hambleton, M. A., Brunskill, E. W., Sayen, M. R., Gottlieb, R. A., Dorn, G. W., Robbins, J. et Molkentin, J. D. (2005). Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* 434, 658–662.
- Baines, C. P., Kaiser, R. A., Sheiko, T., Craigen, W. J. et Molkentin, J. D. (2007). Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat Cell Biol* 9, 550–555.
- Barkla, D. H. et Gibson, P. R. (1999). The fate of epithelial cells in the human large intestine. *Pathology* 31, 230–238.
- Barry, M., Heibei, J. A., Pinkoski, M. J., Lee, S. F., Moyer, R. W., Green, D. R. et Bleackley, R. C. (2000). Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. *Mol Cell Biol* 20, 3781–3794.
- Basañez, G., Nechushtan, A., Drozhinin, O., Chanturiya, A., Choe, E., Tutt, S., Wood, K. A., Hsu, Y., Zimmerberg, J. et Youle, R. J. (1999). Bax, but not Bcl-xL, decreases the lifetime of planar phospholipid bilayer membranes at subnanomolar concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5492–5497.
- Basañez, G., Sharpe, J. C., Galanis, J., Brandt, T. B., Hardwick, J. M. et Zimmerberg, J. (2002). Bax-type apoptotic proteins porate pure lipid bilayers through a mechanism sensitive to intrinsic monolayer curvature. *J Biol Chem* 277, 49360–49365.
- Basañez, G., Zhang, J., Chau, B. N., Maksaev, G. I., Frolov, V. A., Brandt, T. A., Burch, J., Hardwick, J. M. et Zimmerberg, J. (2001). Pro-apoptotic cleavage products of Bcl-xL form cytochrome c-conducting pores in pure lipid membranes. *J Biol Chem* 276, 31083–31091.
- Basso, E., Fante, L., Fowlkes, J., Petronilli, V., Forte, M. A. et Bernardi, P. (2005). Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *J Biol Chem* 280, 18558–18561.
- Bellot, G., Cartron, P., Er, E., Oliver, L., Juin, P., Armstrong, L. C., Bornstein, P., Mihara, K., Manon, S. et Vallette, F. M. (2007). TOM22, a core component of the mitochondria outer membrane protein translocation pore, is a mitochondrial receptor for the proapoptotic protein Bax. *Cell Death Differ* 14, 785–794.
- Bernabeu, A., Guillén, J., Pérez-Berná, A. J., Moreno, M. R. et Villalaín, J. (2007). Structure of the C-terminal domain of the pro-apoptotic protein Hrk and its interaction with model membranes. *Biochim Biophys Acta* 1768, 1659–1670.

- Bijur, G. N. et Jope, R. S. (2003a). Glycogen synthase kinase-3 beta is highly activated in nuclei and mitochondria. *Neuroreport* 14, 2415–2419.
- Bijur, G. N. et Jope, R. S. (2003b). Rapid accumulation of Akt in mitochondria following phosphatidylinositol 3-kinase activation. *J Neurochem* 87, 1427–1435.
- Bouillet, P., Cory, S., Zhang, L. C., Strasser, A. et Adams, J. M. (2001). Degenerative disorders caused by Bcl-2 deficiency prevented by loss of its BH3-only antagonist Bim. *Dev Cell* 1, 645–653.
- Bouillet, P., Metcalf, D., Huang, D. C., Tarlinton, D. M., Kay, T. W., Köntgen, F., Adams, J. M. et Strasser, A. (1999). Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* 286, 1735–1738.
- Boyd, J. M., Gallo, G. J., Elangovan, B., Houghton, A. B., Malstrom, S., Avery, B. J., Ebb, R. G., Subramanian, T., Chittenden, T. et Lutz, R. J. (1995). Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins. *Oncogene* 11, 1921–1928.
- Breitschopf, K., Haendeler, J., Malchow, P., Zeiher, A. M. et Dimmeler, S. (2000). Posttranslational modification of Bcl-2 facilitates its proteasome-dependent degradation : molecular characterization of the involved signaling pathway. *Mol Cell Biol* 20, 1886–1896.
- Bruey, J. M., Ducasse, C., Bonniaud, P., Ravagnan, L., Susin, S. A., Diaz-Latoud, C., Gurbuxani, S., Arrigo, A. P., Kroemer, G., Solary, E. et Garrido, C. (2000). Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol* 2, 645–652.
- Bruns, P. (1868). Die Heilwirkung des Erysipels auf Geschwulste. *Beitr Klin Chir* 3, 443–6.
- Bursch, W., Ellinger, A., Kienzl, H., Török, L., Pandey, S., Sikorska, M., Walker, R. et Hermann, R. S. (1996). Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture : the role of autophagy. *Carcinogenesis* 17, 1595–1607.
- Cabantous, S., Terwilliger, T. C. et Waldo, G. S. (2005). Protein tagging and detection with engineered self-assembling fragments of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 23, 102–107.
- Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N. et Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 3666–3670.
- Cartron, P., Arokium, H., Oliver, L., Meflah, K., Manon, S. et Vallette, F. M. (2005). Distinct domains control the addressing and the insertion of Bax into mitochondria. *J Biol Chem* 280, 10587–10598.
- Cartron, P., Bellot, G., Oliver, L., Grandier-Vazeille, X., Manon, S. et Vallette, F. M. (2008). Bax inserts into the mitochondrial outer membrane by different mechanisms. *FEBS Lett* 582, 3045–3051.
- Cartron, P., Gallenne, T., Bougras, G., Gautier, F., Manero, F., Vusio, P., Meflah, K., Vallette, F. M. et Juin, P. (2004). The First [alpha] Helix of Bax Plays a Necessary Role in Its Ligand-Induced Activation by the BH3-Only Proteins Bid and PUMA. *Mol Cell* 16, 807–818.
- Cartron, P., Moreau, C., Oliver, L., Mayat, E., Meflah, K. et Vallette, F. M. (2002). Involvement of the N-terminus of Bax in its intracellular localization and function. *FEBS Lett* 512, 95–100.
- Cartron, P., Priault, M., Oliver, L., Meflah, K., Manon, S. et Vallette, F. M. (2003). The N-terminal end of Bax contains a mitochondrial-targeting signal. *J Biol Chem* 278, 11633–11641.

- Cartron, P. F., Oliver, L., Mayat, E., Meflah, K. et Vallette, F. M. (2004). Impact of pH on Bax alpha conformation, oligomerisation and mitochondrial integration. *FEBS Lett* 578, 41–46.
- Certo, M., Moore, V. D. G., Nishino, M., Wei, G., Korsmeyer, S., Armstrong, S. A. et Letai, A. (2006). Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell* 9, 351–365.
- Chang, Y. C., Lee, Y. S., Tejima, T., Tanaka, K., Omura, S., Heintz, N. H., Mitsui, Y. et Magae, J. (1998). mdm2 and bax, downstream mediators of the p53 response, are degraded by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell Growth & Differentiation : The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research* 9, 79–84.
- Chanvorachote, P., Nimmannit, U., Stehlik, C., Wang, L., Jiang, B., Ongpipatanakul, B. et Rojanasakul, Y. (2006). Nitric oxide regulates cell sensitivity to cisplatin-induced apoptosis through S-nitrosylation and inhibition of Bcl-2 ubiquitination. *Cancer Res* 66, 6353–6360.
- Chauhan, D., Li, G., Hideshima, T., Podar, K., Mitsiades, C., Mitsiades, N., Catley, L., Tai, Y. T., Hayashi, T., Shringarpure, R., Burger, R., Munshi, N., Ohtake, Y., Saxena, S. et Anderson, K. C. (2003). Hsp27 inhibits release of mitochondrial protein Smac in multiple myeloma cells and confers dexamethasone resistance. *Blood* 102, 3379–3386.
- Chautan, M., Chazal, G., Cecconi, F., Gruss, P. et Golstein, P. (1999). Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway. *Curr Biol* 9, 967–970.
- Chen, L., Willis, S. N., Wei, A., Smith, B. J., Fletcher, J. I., Hinds, M. G., Colman, P. M., Day, C. L., Adams, J. M. et Huang, D. C. S. (2005). Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell* 17, 393–403.
- Chen, M., He, H., Zhan, S., Krajewski, S., Reed, J. C. et Gottlieb, R. A. (2001a). Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion. *J Biol Chem* 276, 30724–30728.
- Chen, W. S., Xu, P. Z., Gottlob, K., Chen, M. L., Sokol, K., Shiyanova, T., Roninson, I., Weng, W., Suzuki, R., Tobe, K., Kadowaki, T. et Hay, N. (2001b). Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes Dev* 15, 2203–2208.
- Cheng, E. H., Kirsch, D. G., Clem, R. J., Ravi, R., Kastan, M. B., Bedi, A., Ueno, K. et Hardwick, J. M. (1997). Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* 278, 1966–1968.
- Cheng, E. H. Y., Sheiko, T. V., Fisher, J. K., Craigen, W. J. et Korsmeyer, S. J. (2003). VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science* 301, 513–517.
- Chipuk, J. E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N. M., Newmeyer, D. D., Schuler, M. et Green, D. R. (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 303, 1010–1014.
- Chittenden, T., Harrington, E. A., O'Connor, R., Flemington, C., Lutz, R. J., Evan, G. I. et Guild, B. C. (1995). Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature* 374, 733–736.
- Choi, S. S., Park, I. C., Yun, J. W., Sung, Y. C., Hong, S. I. et Shin, H. S. (1995). A novel Bcl-2 related gene, Bfl-1, is overexpressed in stomach cancer and preferentially expressed in bone marrow. *Oncogene* 11, 1693–1698.

- Choi, Y. E., Butterworth, M., Malladi, S., Duckett, C. S., Cohen, G. M. et Bratton, S. B. (2009). The E3 ubiquitin ligase cIAP1 binds and ubiquitinates caspase-3 and -7 via unique mechanisms at distinct steps in their processing. *J Biol Chem* 284, 12772–12782.
- Chou, J. J., Li, H., Salvesen, G. S., Yuan, J. et Wagner, G. (1999). Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signaling. *Cell* 96, 615–624.
- Cirman, T., Oresić, K., Mazovec, G. D., Turk, V., Reed, J. C., Myers, R. M., Salvesen, G. S. et Turk, B. (2004). Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis mediated by cleavage of Bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins. *J Biol Chem* 279, 3578–3587.
- Clem, R. J., Cheng, E. H., Karp, C. L., Kirsch, D. G., Ueno, K., Takahashi, A., Kastan, M. B., Griffin, D. E., Earnshaw, W. C., Veluona, M. A. et Hardwick, J. M. (1998). Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 554–559.
- Cohen, H. Y., Lavu, S., Bitterman, K. J., Hekking, B., Imahiyerobo, T. A., Miller, C., Frye, R., Ploegh, H., Kessler, B. M. et Sinclair, D. A. (2004). Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis. *Mol Cell* 13, 627–638.
- Coley, W. B. (1891). II. Contribution to the Knowledge of Sarcoma. *Ann Surg* 14, 199–220.
- Colin, J., Garibal, J., Mignotte, B. et Guénal, I. (2009). The mitochondrial TOM complex modulates bax-induced apoptosis in *Drosophila*. *Biochem Biophys Res Commun* 379, 939–943.
- Colombini, M. (2010). Ceramide channels and their role in mitochondria-mediated apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1797, 1239–1244.
- Condorelli, F., Salomoni, P., Cotteret, S., Cesi, V., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S. et Calabretta, B. (2001). Caspase cleavage enhances the apoptosis-inducing effects of BAD. *Mol Cell Biol* 21, 3025–3036.
- Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M. et Hemmings, B. A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785–789.
- Cuconati, A., Mukherjee, C., Perez, D. et White, E. (2003). DNA damage response and MCL-1 destruction initiate apoptosis in adenovirus-infected cells. *Genes Dev* 17, 2922–2932.
- Danial, N. N., Walensky, L. D., Zhang, C., Choi, C. S., Fisher, J. K., Molina, A. J. A., Datta, S. R., Pitter, K. L., Bird, G. H., Wikstrom, J. D., Deeney, J. T., Robertson, K., Morash, J., Kulkarni, A., Neschen, S., Kim, S., Greenberg, M. E., Corkey, B. E., Shirihai, O. S., Shulman, G. I., Lowell, B. B. et Korsmeyer, S. J. (2008). Dual role of proapoptotic BAD in insulin secretion and beta cell survival. *Nat Med* 14, 144–153.
- Datta, S. R., Katsov, A., Hu, L., Petros, A., Fesik, S. W., Yaffe, M. B. et Greenberg, M. E. (2000). 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol Cell* 6, 41–51.
- Datta, S. R., Ranger, A. M., Lin, M. Z., Sturgill, J. F., Ma, Y., Cowan, C. W., Dikkes, P., Korsmeyer, S. J. et Greenberg, M. E. (2002). Survival factor-mediated BAD phosphorylation raises the mitochondrial threshold for apoptosis. *Dev Cell* 3, 631–643.
- Daugas, E., Nochy, D., Ravagnan, L., Loeffler, M., Susin, S. A., Zamzami, N. et Kroemer, G. (2000). Apoptosis-inducing factor (AIF) : a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Lett* 476, 118–123.

- Day, C. L., Smits, C., Fan, F. C., Lee, E. F., Fairlie, W. D. et Hinds, M. G. (2008). Structure of the BH3 domains from the p53-inducible BH3-only proteins Noxa and Puma in complex with Mcl-1. *J Mol Biol* 380, 958–971.
- Degenhardt, K., Sundararajan, R., Lindsten, T., Thompson, C. et White, E. (2002). Bax and Bak independently promote cytochrome C release from mitochondria. *J Biol Chem* 277, 14127–14134.
- Dejean, L. M., Martinez-Caballero, S., Guo, L., Hughes, C., Teijido, O., Ducret, T., Ichas, F., Korsmeyer, S. J., Antonsson, B., Jonas, E. A. et Kinnally, K. W. (2005). Oligomeric Bax is a component of the putative cytochrome c release channel MAC, mitochondrial apoptosis-induced channel. *Mol Biol Cell* 16, 2424–32.
- Denecker, G., Vercammen, D., Steemans, M., Berghe, T. V., Brouckaert, G., Loo, G. V., Zhivotovsky, B., Fiers, W., Grooten, J., Declercq, W. et Vandenabeele, P. (2001). Death receptor-induced apoptotic and necrotic cell death : differential role of caspases and mitochondria. *Cell Death Differ* 8, 829–840.
- Denisov, A. Y., Madiraju, M. S. R., Chen, G., Khadir, A., Beauparlant, P., Attardo, G., Shore, G. C. et Gehring, K. (2003). Solution structure of human BCL-w : modulation of ligand binding by the C-terminal helix. *J Biol Chem* 278, 21124–21128.
- Desagher, S., Osen-Sand, A., Montessuit, S., Magnenat, E., Vilbois, F., Hochmann, A., Journot, L., Antonsson, B. et Martinou, J. C. (2001). Phosphorylation of bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8. *Mol Cell* 8, 601–11.
- Desagher, S., Osen-Sand, A., Nichols, A., Eskes, R., Montessuit, S., Lauper, S., Maundrell, K., Antonsson, B. et Martinou, J. C. (1999). Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol* 144, 891–901.
- Deter, R. L. et Duve, C. D. (1967). Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *J Cell Biol* 33, 437–449.
- Deveraux, Q. L., Leo, E., Stennicke, H. R., Welsh, K., Salvesen, G. S. et Reed, J. C. (1999). Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *EMBO J* 18, 5242–5251.
- Deveraux, Q. L., Roy, N., Stennicke, H. R., Arsdale, T. V., Zhou, Q., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Salvesen, G. S. et Reed, J. C. (1998). IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J* 17, 2215–2223.
- Deverman, B. E., Cook, B. L., Manson, S. R., Niederhoff, R. A., Langer, E. M., Rosová, I., Kulans, L. A., Fu, X., Weinberg, J. S., Heinecke, J. W., Roth, K. A. et Weintraub, S. J. (2002). Bcl-xL deamidation is a critical switch in the regulation of the response to DNA damage. *Cell* 111, 51–62.
- Dewson, G., Kratina, T., Czabotar, P., Day, C. L., Adams, J. M. et Kluck, R. M. (2009). Bak activation for apoptosis involves oligomerization of dimers via their alpha6 helices. *Mol Cell* 36, 696–703.
- Dewson, G., Kratina, T., Sim, H. W., Puthalakath, H., Adams, J. M., Colman, P. M. et Kluck, R. M. (2008). To trigger apoptosis, Bak exposes its BH3 domain and homodimerizes via BH3 :groove interactions. *Mol Cell* 30, 369–380.
- Diehl, J. A., Cheng, M., Roussel, M. F. et Sherr, C. J. (1998). Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* 12, 3499–3511.

- Ding, J., Zhang, Z., Roberts, G. J., Falcone, M., Miao, Y., Shao, Y., Zhang, X. C., Andrews, D. W. et Lin, J. (2010). BCL-2 and bax interact via the BH1-3 groove :BH3 motif interface and a novel interface involving the BH4 motif. *J Biol Chem* 285, 28749–63.
- Doelling, J. H., Walker, J. M., Friedman, E. M., Thompson, A. R. et Vierstra, R. D. (2002). The APG8/12-activating enzyme APG7 is required for proper nutrient recycling and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 277, 33105–33114.
- Domina, A. M., Vrana, J. A., Gregory, M. A., Hann, S. R. et Craig, R. W. (2004). MCL1 is phosphorylated in the PEST region and stabilized upon ERK activation in viable cells, and at additional sites with cytotoxic okadaic acid or taxol. *Oncogene* 23, 5301–5315.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. et Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102, 33–42.
- Dumont, M. E., Ernst, J. F. et Sherman, F. (1988). Coupling of heme attachment to import of cytochrome c into yeast mitochondria. Studies with heme lyase-deficient mitochondria and altered apocytochromes c. *J Biol Chem* 263, 15928–15937.
- Elangovan, B. et Chinnadurai, G. (1997). Functional dissection of the pro-apoptotic protein Bik. Heterodimerization with anti-apoptosis proteins is insufficient for induction of cell death. *J Biol Chem* 272, 24494–24498.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. et Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43–50.
- Endo, T. et Yamano, K. (2009). Multiple pathways for mitochondrial protein traffic. *Biol Chem* 390, 723–730.
- Epand, R. F., Martinou, J., Fornallaz-Mulhauser, M., Hughes, D. W. et Epand, R. M. (2002). The apoptotic protein tBid promotes leakage by altering membrane curvature. *J Biol Chem* 277, 32632–32639.
- Ericsson, J. L. (1969). Studies on induced cellular autophagy. I. Electron microscopy of cells with in vivo labelled lysosomes. *Exp Cell Res* 55, 95–106.
- Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B. et Martinou, J. C. (2000). Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* 20, 929–935.
- Esposti, M. D., Erler, J. T., Hickman, J. A. et Dive, C. (2001). Bid, a widely expressed proapoptotic protein of the Bcl-2 family, displays lipid transfer activity. *Mol Cell Biol* 21, 7268–7276.
- Esposti, M. D., Ferry, G., Masdehors, P., Boutin, J. A., Hickman, J. A. et Dive, C. (2003). Post-translational modification of Bid has differential effects on its susceptibility to cleavage by caspase 8 or caspase 3. *J Biol Chem* 278, 15749–15757.
- Fadok, V. A. (1999). Clearance : the last and often forgotten stage of apoptosis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 4, 203–211.
- Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L. et Henson, P. M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 148, 2207–2216.

- Fang, X., Yu, S. X., Lu, Y., Bast, R. C., Woodgett, J. R. et Mills, G. B. (2000). Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 11960–11965.
- Farrow, S. N., White, J. H., Martinou, I., Raven, T., Pun, K. T., Grinham, C. J., Martinou, J. C. et Brown, R. (1995). Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K. *Nature* 374, 731–3.
- Fernandes-Alnemri, T., Armstrong, R. C., Krebs, J., Srinivasula, S. M., Wang, L., Bullrich, F., Fritz, L. C., Trapani, J. A., Tomaselli, K. J., Litwack, G. et Alnemri, E. S. (1996). In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7464–7469.
- Fiol, C. J., Mahrenholz, A. M., Wang, Y., Roeske, R. W. et Roach, P. J. (1987). Formation of protein kinase recognition sites by covalent modification of the substrate. Molecular mechanism for the synergistic action of casein kinase II and glycogen synthase kinase 3. *J Biol Chem* 262, 14042–8.
- Gallenne, T., Gautier, F., Oliver, L., Hervouet, E., Noël, B., Hickman, J. A., Geneste, O., Cartron, P., Vallette, F. M., Manon, S. et Juin, P. (2009). Bax activation by the BH3-only protein Puma promotes cell dependence on antiapoptotic Bcl-2 family members. *J Cell Biol* 185, 279–290.
- Ganesan, V., Perera, M. N., Colombini, D., Datskovskiy, D., Chadha, K. et Colombini, M. (2010). Ceramide and activated Bax act synergistically to permeabilize the mitochondrial outer membrane. *Apoptosis : An International Journal on Programmed Cell Death* 15, 553–562.
- Gao, S., Fu, W., Dürrenberger, M., Geyter, C. D. et Zhang, H. (2005). Membrane translocation and oligomerization of hBok are triggered in response to apoptotic stimuli and Bnip3. *Cell Mol Life Sci* 62, 1015–1024.
- Garcia-Saez, A., Mingarro, I., Perez-Paya, E. et Salgado, J. (2004). Membrane-Insertion Fragments of Bcl-xL, Bax, and Bid. *Biochemistry* 43, 10930–10943.
- Garcia-Saez, A. J., Coraiola, M., Serra, M. D., Mingarro, I., Muller, P. et Salgado, J. (2006). Peptides corresponding to helices 5 and 6 of Bax can independently form large lipid pores. *FEBS Journal* 273, 971–981.
- García-Sáez, A. J., Coraiola, M., Serra, M. D., Mingarro, I., Menestrina, G. et Salgado, J. (2005). Peptides derived from apoptotic Bax and Bid reproduce the poration activity of the parent full-length proteins. *Biophys J* 88, 3976–3990.
- Gardai, S. J., Hildeman, D. A., Frankel, S. K., Whitlock, B. B., Frasch, S. C., Borregaard, N., Marrack, P., Bratton, D. L. et Henson, P. M. (2004). Phosphorylation of Bax Ser184 by Akt regulates its activity and apoptosis in neutrophils. *J Biol Chem* 279, 21085–95.
- Gavathiotis, E., Suzuki, M., Davis, M. L., Pitter, K., Bird, G. H., Katz, S. G., Tu, H., Kim, H., Cheng, E. H., Tjandra, N. et Walensky, L. D. (2008). BAX activation is initiated at a novel interaction site. *Nature* 455, 1076–1081.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y. et Ben-Sasson, S. A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119, 493–501.
- Germain, M., Mathai, J. P., McBride, H. M. et Shore, G. C. (2005). Endoplasmic reticulum BIK initiates DRP1-regulated remodelling of mitochondrial cristae during apoptosis. *EMBO J* 24, 1546–1556.

- Gillissen, B., Essmann, F., Hemmati, P. G., Richter, A., Richter, A., Oztop, I., Chinnadurai, G., Dörken, B. et Daniel, P. T. (2007). Mcl-1 determines the Bax dependency of Nbk/Bik-induced apoptosis. *J Cell Biol* 179, 701–715.
- Gilmore, A. P., Metcalfe, A. D., Romer, L. H. et Streuli, C. H. (2000). Integrin-mediated survival signals regulate the apoptotic function of Bax through its conformation and subcellular localization. *J Cell Biol* 149, 431–446.
- Giraud, M. F. et Velours, J. (1997). The absence of the mitochondrial ATP synthase delta subunit promotes a slow growth phenotype of rho- yeast cells by a lack of assembly of the catalytic sector F1. *Eur J Biochem* 245, 813–818.
- Gong, X., Choi, J., Franzin, C. M., Zhai, D., Reed, J. C. et Marassi, F. M. (2004). Conformation of membrane-associated proapoptotic tBid. *J Biol Chem* 279, 28954–28960.
- Gonzalvez, F. et Gottlieb, E. (2007). Cardiolipin : setting the beat of apoptosis. *Apoptosis : An International Journal on Programmed Cell Death* 12, 877–885.
- Gonzalvez, F., Pariselli, F., Dupaigne, P., Budihardjo, I., Lutter, M., Antonsson, B., Dirolez, P., Manon, S., Martinou, J., Gubern, M., Wang, X., Bernard, S. et Petit, P. X. (2005). tBid interaction with cardiolipin primarily orchestrates mitochondrial dysfunctions and subsequently activates Bax and Bak. *Cell Death Differ* 12, 614–626.
- Gonzalvez, F., Schug, Z. T., Houtkooper, R. H., MacKenzie, E. D., Brooks, D. G., Wanders, R. J. A., Petit, P. X., Vaz, F. M. et Gottlieb, E. (2008). Cardiolipin provides an essential activating platform for caspase-8 on mitochondria. *J Cell Biol* 183, 681–696.
- Goode, N., Hughes, K., Woodgett, J. R. et Parker, P. J. (1992). Differential regulation of glycogen synthase kinase-3 beta by protein kinase C isotypes. *J Biol Chem* 267, 16878–16882.
- Goping, I. S., Barry, M., Liston, P., Sawchuk, T., Constantinescu, G., Michalak, K. M., Shostak, I., Roberts, D. L., Hunter, A. M., Korneluk, R. et Bleackley, R. C. (2003). Granzyme B-induced apoptosis requires both direct caspase activation and relief of caspase inhibition. *Immunity* 18, 355–365.
- Goping, I. S., Gross, A., Lavoie, J. N., Nguyen, M., Jemmerson, R., Roth, K., Korsmeyer, S. J. et Shore, G. C. (1998). Regulated targeting of BAX to mitochondria. *J Cell Biol* 143, 207–215.
- Gorman, A. M., Heavey, B., Creagh, E., Cotter, T. G. et Samali, A. (1999). Antioxidant-mediated inhibition of the heat shock response leads to apoptosis. *FEBS Lett* 445, 98–102.
- Gray, C. W., Ward, R. V., Karan, E., Turconi, S., Rowles, A., Viglienghi, D., Southan, C., Barton, A., Fantom, K. G., West, A., Savopoulos, J., Hassan, N. J., Clinkenbeard, H., Hanning, C., Amegadzie, B., Davis, J. B., Dingwall, C., Livi, G. P. et Creasy, C. L. (2000). Characterization of human HtrA2, a novel serine protease involved in the mammalian cellular stress response. *Eur J Biochem* 267, 5699–5710.
- Greenhalf, W., Stephan, C. et Chaudhuri, B. (1996). Role of mitochondria and C-terminal membrane anchor of Bcl-2 in Bax induced growth arrest and mortality in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 380, 169–175.
- Griffin, B. A., Adams, S. R. et Tsien, R. Y. (1998). Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. *Science* 281, 269–272.

- Griffiths, G. J., Dubrez, L., Morgan, C. P., Jones, N. A., Whitehouse, J., Corfe, B. M., Dive, C. et Hickman, J. A. (1999). Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol* 144, 903–914.
- Gunter, T. E., Yule, D. I., Gunter, K. K., Eliseev, R. A. et Salter, J. D. (2004). Calcium and mitochondria. *FEBS Lett* 567, 96–102.
- Guo, B., Zhai, D., Cabezas, E., Welsh, K., Nouraini, S., Satterthwait, A. C. et Reed, J. C. (2003). Humanin peptide suppresses apoptosis by interfering with Bax activation. *Nature* 423, 456–461.
- Guo, L., Pietkiewicz, D., Pavlov, E. V., Grigoriev, S. M., Kasianowicz, J. J., Dejean, L. M., Korsmeyer, S. J., Antonsson, B. et Kinnally, K. W. (2004). Effects of cytochrome c on the mitochondrial apoptosis-induced channel MAC. *Am J Physiol Cell Physiol* 286, C1109–1117.
- Hamburger, V. et Levi-Montalcini, R. (1949). Proliferation, differentiation and degeneration in the spinal ganglia of the chick embryo under normal and experimental conditions. *J Exp Zool* 111, 457–501.
- Hansen, T. M., Smith, D. J. et Nagley, P. (2006). Smac/DIABLO is not released from mitochondria during apoptotic signalling in cells deficient in cytochrome c. *Cell Death Differ* 13, 1181–1190.
- Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H. et Mizushima, N. (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441, 885–889.
- Harada, H., Quearry, B., Ruiz-Vela, A. et Korsmeyer, S. J. (2004). Survival factor-induced extracellular signal-regulated kinase phosphorylates BIM, inhibiting its association with BAX and proapoptotic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15313–15317.
- Havasi, A., Li, Z., Wang, Z., Martin, J. L., Botla, V., Ruchalski, K., Schwartz, J. H. et Borkan, S. C. (2008). Hsp27 inhibits Bax activation and apoptosis via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *J Biol Chem* 283, 12305–12313.
- Hengartner, M. O. et Horvitz, H. R. (1994). *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell* 76, 665–676.
- Hinds, M. G., Lackmann, M., Skea, G. L., Harrison, P. J., Huang, D. C. S. et Day, C. L. (2003). The structure of Bcl-w reveals a role for the C-terminal residues in modulating biological activity. *EMBO J* 22, 1497–1507.
- Hinds, M. G., Smits, C., Fredericks-Short, R., Risk, J. M., Bailey, M., Huang, D. C. S. et Day, C. L. (2007). Bim, Bad and Bmf : intrinsically unstructured BH3-only proteins that undergo a localized conformational change upon binding to prosurvival Bcl-2 targets. *Cell Death Differ* 14, 128–136.
- Hirota, M., Zhang, Y., Fujita, N., Naito, M. et Tsuruo, T. (1999). NH2-terminal BH4 domain of Bcl-2 is functional for heterodimerization with Bax and inhibition of apoptosis. *J Biol Chem* 274, 20415–20420.
- Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J. L., Schneider, P., Seed, B. et Tschopp, J. (2000). Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol* 1, 489–495.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. et Harris, C. C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science* 253, 49–53.

- Holmgreen, S. P., Huang, D. C., Adams, J. M. et Cory, S. (1999). Survival activity of Bcl-2 homologs Bcl-w and A1 only partially correlates with their ability to bind pro-apoptotic family members. *Cell Death Differ* 6, 525–532.
- Hooke, R. (1665). *Micrographia* : or, Some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses.
- Hoppins, S. et Nunnari, J. (2009). The molecular mechanism of mitochondrial fusion. *Biochim Biophys Acta* 1793, 20–26.
- Horvitz, H. R., Sternberg, P. W., Greenwald, I. S., Fixsen, W. et Ellis, H. M. (1983). Mutations that affect neural cell lineages and cell fates during the development of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 48 Pt 2, 453–463.
- Hoshi, M., Takashima, A., Noguchi, K., Murayama, M., Sato, M., Kondo, S., Saitoh, Y., Ishiguro, K., Hoshino, T. et Imahori, K. (1996). Regulation of mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity by tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3 $\beta$  in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2719–2723.
- Hsu, S. Y., Kaipia, A., McGee, E., Lomeli, M. et Hsueh, A. J. W. (1997a). Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12401–12406.
- Hsu, Y. T., Wolter, K. G. et Youle, R. J. (1997b). Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3668–3672.
- Hsu, Y. T. et Youle, R. J. (1998). Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. *J Biol Chem* 273, 10777–10783.
- Huang, D. C., Adams, J. M. et Cory, S. (1998). The conserved N-terminal BH4 domain of Bcl-2 homologues is essential for inhibition of apoptosis and interaction with CED-4. *EMBO J* 17, 1029–1039.
- Hübner, A., Cavanagh-Kyros, J., Rincon, M., Flavell, R. A. et Davis, R. J. (2010). Functional cooperation of the proapoptotic Bcl2 family proteins Bmf and Bim in vivo. *Mol Cell Biol* 30, 98–105.
- Inohara, N., Ding, L., Chen, S. et Núñez, G. (1997). harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L). *EMBO J* 16, 1686–1694.
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J. L., Schröter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L. E. et Tschopp, J. (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388, 190–195.
- Jabbour, A. M., Heraud, J. E., Daunt, C. P., Kaufmann, T., Sandow, J., O'Reilly, L. A., Callus, B. A., Lopez, A., Strasser, A., Vaux, D. L. et Ekert, P. G. (2009). Puma indirectly activates Bax to cause apoptosis in the absence of Bid or Bim. *Cell Death Differ* 16, 555–563.
- Jürgensmeier, J. M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D. et Reed, J. C. (1998). Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci* 95, 4997–5002.
- Karbowsky, M., Norris, K. L., Cleland, M. M., Jeong, S. et Youle, R. J. (2006). Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis. *Nature* 443, 658–662.

- Karsan, A., Yee, E. et Harlan, J. M. (1996). Endothelial cell death induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  is inhibited by the Bcl-2 family member, A1. *J Biol Chem* 271, 27201–27204.
- Kaufmann, T., Schlipf, S., Sanz, J., Neubert, K., Stein, R. et Borner, C. (2003). Characterization of the signal that directs Bcl-x(L), but not Bcl-2, to the mitochondrial outer membrane. *J Cell Biol* 160, 53–64.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. et Currie, A. R. (1972). Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239–57.
- Khaled, A. R., Moor, A. N., Li, A., Kim, K., Ferris, D. K., Muegge, K., Fisher, R. J., Fliegel, L. et Durum, S. K. (2001). Trophic factor withdrawal : p38 mitogen-activated protein kinase activates NHE1, which induces intracellular alkalinization. *Mol Cell Biol* 21, 7545–7557.
- Kiefer, M. C., Brauer, M. J., Powers, V. C., Wu, J. J., Umansky, S. R., Tomei, L. D. et Barr, P. J. (1995). Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. *Nature* 374, 736–739.
- Kim, B., Ryu, S. et Song, B. (2006a). JNK- and p38 Kinase-mediated Phosphorylation of Bax Leads to Its Activation and Mitochondrial Translocation and to Apoptosis of Human Hepatoma HepG2 Cells. *J Biol Chem* 281, 21256–21265.
- Kim, H., Rafiuddin-Shah, M., Tu, H., Jeffers, J. R., Zambetti, G. P., Hsieh, J. J. et Cheng, E. H. (2006b). Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat Cell Biol* 8, 1348–1358.
- Kim, H., Tu, H., Ren, D., Takeuchi, O., Jeffers, J. R., Zambetti, G. P., Hsieh, J. J. et Cheng, E. H. (2009). Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 36, 487–499.
- Kim, H. J., Oh, J. E., Kim, S. W., Chun, Y. J. et Kim, M. Y. (2008). Ceramide induces p38 MAPK-dependent apoptosis and Bax translocation via inhibition of Akt in HL-60 cells. *Cancer Lett* 260, 88–95.
- Kirsch, D. G., Doseff, A., Chau, B. N., Lim, D. S., de Souza-Pinto, N. C., Hansford, R., Kastan, M. B., Lazebnik, Y. A. et Hardwick, J. M. (1999). Caspase-3-dependent cleavage of Bcl-2 promotes release of cytochrome c. *J Biol Chem* 274, 21155–21161.
- Kluck, R. M., Bossy-Wetzel, E., Green, D. R. et Newmeyer, D. D. (1997). The release of cytochrome c from mitochondria : a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275, 1132–1136.
- Kobayashi, H., Sunako, M., Hayashi, M. et Murooka, Y. (2001). DNA synthesis and fragmentation in bacteroids during *Astragalus sinicus* root nodule development. *Biosci Biotechnol Biochem* 65, 510–515.
- Kokoszka, J. E., Waymire, K. G., Levy, S. E., Sligh, J. E., Cai, J., Jones, D. P., MacGregor, G. R. et Wallace, D. C. (2004). The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature* 427, 461–465.
- Kolliputi, N. et Waxman, A. B. (2009). IL-6 cytoprotection in hyperoxic acute lung injury occurs via PI3K/Akt-mediated Bax phosphorylation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297, L6–16.
- Komarova, E. Y., Afanasyeva, E. A., Bulatova, M. M., Cheetham, M. E., Margulis, B. A. et Guzhova, I. V. (2004). Downstream caspases are novel targets for the antiapoptotic activity of the molecular chaperone hsp70. *Cell Stress Chaperones* 9, 265–275.

- Koopman, G., Reutelingsperger, C. P., Kuijten, G. A., Keehnen, R. M., Pals, S. T. et van Oers, M. H. (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84, 1415–1420.
- Kozopas, K. M., Yang, T., Buchan, H. L., Zhou, P. et Craig, R. W. (1993). MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3516–3520.
- Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M. J., Fenton, W. et Reed, J. C. (1993). Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein : residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res* 53, 4701–4714.
- Krauskopf, A., Eriksson, O., Craigen, W. J., Forte, M. A. et Bernardi, P. (2006). Properties of the permeability transition in VDAC1(-/-) mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1757, 590–595.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E., Baehrecke, E., Blagosklonny, M., El-Deiry, W., Golstein, P., Green, D., Hengartner, M., Knight, R., Kumar, S., Lipton, S., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B. et Melino, G. (2009). Classification of cell death. *Cell Death Differ* 16, 3–11.
- Krysko, D. V., Denecker, G., Festjens, N., Gabriels, S., Parthoens, E., D’Herde, K. et Vandenabeele, P. (2006). Macrophages use different internalization mechanisms to clear apoptotic and necrotic cells. *Cell Death Differ* 13, 2011–2022.
- Kucharczak, J., Simmons, M. J., Fan, Y. et Gélinas, C. (2003). To be, or not to be : NF-kappaB is the answer—role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene* 22, 8961–8982.
- Kulikov, R., Boehme, K. A. et Blattner, C. (2005). Glycogen synthase kinase 3-dependent phosphorylation of Mdm2 regulates p53 abundance. *Mol Cell Biol* 25, 7170–7180.
- Kuwana, T., Mackey, M. R., Perkins, G., Ellisman, M. H., Latterich, M., Schneider, R., Green, D. R. et Newmeyer, D. D. (2002). Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* 111, 331–342.
- Kvansakul, M., Yang, H., Fairlie, W. D., Czabotar, P. E., Fischer, S. F., Perugini, M. A., Huang, D. C. S. et Colman, P. M. (2008). Vaccinia virus anti-apoptotic F1L is a novel Bcl-2-like domain-swapped dimer that binds a highly selective subset of BH3-containing death ligands. *Cell Death Differ* 15, 1564–1571.
- Lemasters, J. J., Nieminen, A. L., Qian, T., Trost, L. C. et Herman, B. (1997). The mitochondrial permeability transition in toxic, hypoxic and reperfusion injury. *Mol Cell Biochem* 174, 159–165.
- Leu, J. I., Dumont, P., Hafey, M., Murphy, M. E. et George, D. L. (2004). Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat Cell Biol* 6, 443–450.
- Li, B. et Dou, Q. P. (2000). Bax degradation by the ubiquitin/proteasome-dependent pathway : involvement in tumor survival and progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3850–3855.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C. J. et Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491–501.
- Liesa, M., Palacín, M. et Zorzano, A. (2009). Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol Rev* 89, 799–845.

- Lindsten, T., Ross, A. J., King, A., Zong, W. X., Rathmell, J. C., Shiels, H. A., Ulrich, E., Waymire, K. G., Mahar, P., Frauwirth, K., Chen, Y., Wei, M., Eng, V. M., Adelman, D. M., Simon, M. C., Ma, A., Golden, J. A., Evan, G., Korsmeyer, S. J., MacGregor, G. R. et Thompson, C. B. (2000). The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell* 6, 1389–99.
- Linseman, D. A., Butts, B. D., Precht, T. A., Phelps, R. A., Le, S. S., Laessig, T. A., Bouchard, R. J., Florez-McClure, M. L. et Heidenreich, K. A. (2004). Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  phosphorylates Bax and promotes its mitochondrial localization during neuronal apoptosis. *J Neurosci* 24, 9993–10002.
- Liu, S., Pereira, N. A., Teo, J. J., Miller, P., Shah, P. et Song, Z. (2007). Mitochondrially targeted Bcl-2 and Bcl-X(L) chimeras elicit different apoptotic responses. *Mol Cells* 24, 378–387.
- Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R. et Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts : requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86, 147–157.
- Lovell, J. F., Billen, L. P., Bindner, S., Shamas-Din, A., Fradin, C., Leber, B. et Andrews, D. W. (2008). Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax. *Cell* 135, 1074–1084.
- Lovrekovich, L., Klement, Z. et Farkas, G. L. (1964). Toxic effect of *Pseudomonas tabaci* on RNA metabolism in tobacco and its counteraction by kinetin. *Science* 145, 165.
- Luciano, F., Jacquelin, A., Colosetti, P., Herrant, M., Cagnol, S., Pages, G. et Auberger, P. (2003). Phosphorylation of Bim-EL by Erk1/2 on serine 69 promotes its degradation via the proteasome pathway and regulates its proapoptotic function. *Oncogene* 22, 6785–6793.
- Lucken-Ardjomande, S., Montessuit, S. et Martinou, J. (2008). Bax activation and stress-induced apoptosis delayed by the accumulation of cholesterol in mitochondrial membranes. *Cell Death Differ* 15, 484–493.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. et Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481–490.
- Lutter, M., Fang, M., Luo, X., Nishijima, M., Xie, X. et Wang, X. (2000). Cardiolipin provides specificity for targeting of tBid to mitochondria. *Nat Cell Biol* 2, 754–761.
- Lutter, M., Perkins, G. A. et Wang, X. (2001). The pro-apoptotic Bcl-2 family member tBid localizes to mitochondrial contact sites. *BMC Cell Biology* 2, 22.
- Léger, J., Kempf, M., Lee, G. et Brandt, R. (1997). Conversion of serine to aspartate imitates phosphorylation-induced changes in the structure and function of microtubule-associated protein tau. *J Biol Chem* 272, 8441–8446.
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T. et Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298, 1912–1934.
- Manon, S., Chaudhuri, B. et Guérin, M. (1997). Release of cytochrome c and decrease of cytochrome c oxidase in Bax-expressing yeast cells, and prevention of these effects by coexpression of Bcl-xL. *FEBS Lett* 415, 29–32.

- Marchenko, N. D., Zaika, A. et Moll, U. M. (2000). Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem* 275, 16202–16212.
- Martinez-Caballero, S., Dejean, L. M., Kinnally, M. S., Oh, K. J., Mannella, C. A. et Kinnally, K. W. (2009). Assembly of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC. *J Biol Chem* 284, 12235–12245.
- Mathai, J. P., Germain, M. et Shore, G. C. (2005). BH3-only BIK regulates BAX,BAK-dependent release of Ca<sup>2+</sup> from endoplasmic reticulum stores and mitochondrial apoptosis during stress-induced cell death. *J Biol Chem* 280, 23829–23836.
- Maurer, U., Charvet, C., Wagman, A. S., Dejardin, E. et Green, D. R. (2006). Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. *Mol Cell* 21, 749–760.
- McDonnell, J. M., Fushman, D., Milliman, C. L., Korsmeyer, S. J. et Cowburn, D. (1999). Solution structure of the proapoptotic molecule BID : a structural basis for apoptotic agonists and antagonists. *Cell* 96, 625–634.
- Meijerink, J. P., Mensink, E. J., Wang, K., Sedlak, T. W., Slöetjes, A. W., de Witte, T., Waksman, G. et Korsmeyer, S. J. (1998). Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of BAX. *Blood* 91, 2991–2997.
- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P. et Moll, U. M. (2003). p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* 11, 577–590.
- Milhas, D., Cuvillier, O., Therville, N., Clavé, P., Thomsen, M., Levade, T., Benoist, H. et Ségui, B. (2005). Caspase-10 triggers Bid cleavage and caspase cascade activation in FasL-induced apoptosis. *J Biol Chem* 280, 19836–19842.
- Ming, L., Wang, P., Bank, A., Yu, J. et Zhang, L. (2006). PUMA Dissociates Bax and Bcl-X(L) to induce apoptosis in colon cancer cells. *J Biol Chem* 281, 16034–16042.
- Minn, A. J., Vélez, P., Schendel, S. L., Liang, H., Muchmore, S. W., Fesik, S. W., Fill, M. et Thompson, C. B. (1997). Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* 385, 353–357.
- Mitchell, K. O., Ricci, M. S., Miyashita, T., Dicker, D. T., Jin, Z., Reed, J. C. et El-Deiry, W. S. (2000). Bax is a transcriptional target and mediator of c-myc-induced apoptosis. *Cancer Res* 60, 6318–6325.
- Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191, 144–148.
- Miyashita, T. et Reed, J. C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80, 293–299.
- Moroni, M. C., Hickman, E. S., Denchi, E. L., Caprara, G., Colli, E., Cecconi, F., Müller, H. et Helin, K. (2001). Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. *Nat Cell Biol* 3, 552–558.
- Motoyama, N., Wang, F., Roth, K. A., Sawa, H., Nakayama, K., Nakayama, K., Negishi, I., Senju, S., Zhang, Q. et Fujii, S. (1995). Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science* 267, 1506–1510.

- Motyl, T., Gajkowska, B., Zarzyńska, J., Gajewska, M. et Lamparska-Przybysz, M. (2006). Apoptosis and autophagy in mammary gland remodeling and breast cancer chemotherapy. *Journal of Physiology and Pharmacology : An Official Journal of the Polish Physiological Society* 57 Suppl 7, 17–32.
- Motz, C., Martin, H., Krimmer, T. et Rassow, J. (2002). Bcl-2 and porin follow different pathways of TOM-dependent insertion into the mitochondrial outer membrane. *J Mol Biol* 323, 729–738.
- Muchmore, S. W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Yoon, H. S., Nettesheim, D., Chang, B. S., Thompson, C. B., Wong, S., Ng, S. et Fesik, S. W. (1996). X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 381, 335–341.
- Muzio, M., Salvesen, G. S. et Dixit, V. M. (1997). FLICE induced apoptosis in a cell-free system. Cleavage of caspase zymogens. *J Biol Chem* 272, 2952–2956.
- Müller, M., Wilder, S., Bannasch, D., Israeli, D., Lehlbach, K., Li-Weber, M., Friedman, S. L., Galle, P. R., Stremmel, W., Oren, M. et Krammer, P. H. (1998). p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med* 188, 2033–2045.
- Nakagawa, T., Shimizu, S., Watanabe, T., Yamaguchi, O., Otsu, K., Yamagata, H., Inohara, H., Kubo, T. et Tsujimoto, Y. (2005). Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* 434, 652–658.
- Nakagawa, T. et Yuan, J. (2000). Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol* 150, 887–894.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A. et Yuan, J. (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403, 98–103.
- Nakano, K. et Vousden, K. H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 7, 683–694.
- Nargang, F. E., Drygas, M. E., Kwong, P. L., Nicholson, D. W. et Neupert, W. (1988). A mutant of *Neurospora crassa* deficient in cytochrome c heme lyase activity cannot import cytochrome c into mitochondria. *J Biol Chem* 263, 9388–9394.
- Narita, M., Shimizu, S., Ito, T., Chittenden, T., Lutz, R. J., Matsuda, H. et Tsujimoto, Y. (1998). Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14681–14686.
- Nechushtan, A., Smith, C. L., Hsu, Y. T. et Youle, R. J. (1999). Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. *EMBO J* 18, 2330–41.
- Neupert, W. et Herrmann, J. M. (2007). Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem* 76, 723–749.
- Nguyen, M., Millar, D. G., Yong, V. W., Korsmeyer, S. J. et Shore, G. C. (1993). Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *J Biol Chem* 268, 25265–8.
- Nie, Z., Phenix, B. N., Lum, J. J., Alam, A., Lynch, D. H., Beckett, B., Krammer, P. H., Sekaly, R. P. et Badley, A. D. (2002). HIV-1 protease processes procaspase 8 to cause mitochondrial release of cytochrome c, caspase cleavage and nuclear fragmentation. *Cell Death Differ* 9, 1172–1184.

- Nomura, M., Shimizu, S., Sugiyama, T., Narita, M., Ito, T., Matsuda, H. et Tsujimoto, Y. (2003). 14-3-3 Interacts Directly with and Negatively Regulates Pro-apoptotic Bax. *J Biol Chem* 278, 2058–2065.
- Norberg, E., Gogvadze, V., Ott, M., Horn, M., Uhlén, P., Orrenius, S. et Zhivotovsky, B. (2008). An increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> is required for the activation of mitochondrial calpain to release AIF during cell death. *Cell Death Differ* 15, 1857–1864.
- Norberg, E., Gogvadze, V., Vakifahmetoglu, H., Orrenius, S. et Zhivotovsky, B. (2010). Oxidative modification sensitizes mitochondrial apoptosis-inducing factor to calpain-mediated processing. *Free Radic Biol Med* 48, 791–797.
- Nouraini, S., Six, E., Matsuyama, S., Krajewski, S. et Reed, J. C. (2000). The putative pore-forming domain of Bax regulates mitochondrial localization and interaction with Bcl-X(L). *Mol Cell Biol* 20, 1604–15.
- O'Connor, L., Strasser, A., O'Reilly, L. A., Hausmann, G., Adams, J. M., Cory, S. et Huang, D. C. (1998). Bim : a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J* 17, 384–395.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T. et Tanaka, N. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288, 1053–1058.
- Oh, K. J., Barbuto, S., Meyer, N., Kim, R., Collier, R. J. et Korsmeyer, S. J. (2005). Conformational changes in BID, a pro-apoptotic BCL-2 family member, upon membrane binding. A site-directed spin labeling study. *J Biol Chem* 280, 753–767.
- Oh, K. J., Singh, P., Lee, K., Foss, K., Lee, S., Park, M., Lee, S., Aluvila, S., Park, M., Singh, P., Kim, R., Symersky, J. et Walters, D. E. (2010). Conformational changes in BAK, a pore-forming proapoptotic Bcl-2 family member, upon membrane insertion and direct evidence for the existence of BH3-BH3 contact interface in BAK homo-oligomers. *J Biol Chem* 285, 28924–28937.
- Okamoto, K. et Shaw, J. M. (2005). Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annu Rev Genet* 39, 503–536.
- Oltvai, Z. N., Millman, C. L. et Korsmeyer, S. J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74, 609–19.
- O'Malley, W. E., Achinstein, B. et Shear, M. J. (1962). Journal of the National Cancer Institute, Vol. 29, 1962 : Action of bacterial polysaccharide on tumors. II. Damage of sarcoma 37 by serum of mice treated with *Serratia marcescens* polysaccharide, and induced tolerance. *Nutr Rev* 46, 389–391.
- Ott, M., Zhivotovsky, B. et Orrenius, S. (2007). Role of cardiolipin in cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ* 14, 1243–1247.
- Owens, T. W., Valentijn, A. J., Upton, J., Keeble, J., Zhang, L., Lindsay, J., Zouq, N. K. et Gilmore, A. P. (2009). Apoptosis commitment and activation of mitochondrial Bax during anoikis is regulated by p38MAPK. *Cell Death Differ* 16, 1551–1562.
- Pagliari, L. J., Kuwana, T., Bonzon, C., Newmeyer, D. D., Tu, S., Beere, H. M. et Green, D. R. (2005). The multidomain proapoptotic molecules Bax and Bak are directly activated by heat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 17975–17980.

- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X. H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M. D. et Levine, B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122, 927–939.
- Pavlov, E. V., Priault, M., Pietkiewicz, D., Cheng, E. H., Antonsson, B., Manon, S., Korsmeyer, S. J., Mannella, C. A. et Kinnally, K. W. (2001). A novel, high conductance channel of mitochondria linked to apoptosis in mammalian cells and Bax expression in yeast. *J Cell Biol* 155, 725–31.
- Pennica, D., Nedwin, G. E., Hayflick, J. S., Seeburg, P. H., Derynck, R., Palladino, M. A., Kohr, W. J., Aggarwal, B. B. et Goeddel, D. V. (1984). Human tumour necrosis factor : precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 312, 724–729.
- Petit, F., Arnoult, D., Viollet, L. et Estaquier, J. (2003). Intrinsic and extrinsic pathways signaling during HIV-1 mediated cell death. *Biochimie* 85, 795–811.
- Petros, A. M., Nettesheim, D. G., Wang, Y., Olejniczak, E. T., Meadows, R. P., Mack, J., Swift, K., Matayoshi, E. D., Zhang, H., Thompson, C. B. et Fesik, S. W. (2000). Rationale for Bcl-xL/Bad peptide complex formation from structure, mutagenesis, and biophysical studies. *Protein Science : A Publication of the Protein Society* 9, 2528–2534.
- Peyerl, F. W., Dai, S., Murphy, G. A., Crawford, F., White, J., Marrack, P. et Kappler, J. W. (2007). Elucidation of some Bax conformational changes through crystallization of an antibody-peptide complex. *Cell Death Differ* 14, 447–452.
- Polster, B. M., Basañez, G., Etxebarria, A., Hardwick, J. M. et Nicholls, D. G. (2005). Calpain I induces cleavage and release of apoptosis-inducing factor from isolated mitochondria. *J Biol Chem* 280, 6447–6454.
- Priault, M., Camougrand, N., Chaudhuri, B. et Manon, S. (1999). Role of the C-terminal domain of Bax and Bcl-XL in their localization and function in yeast cells. *FEBS Lett* 443, 225–228.
- Priault, M., Cartron, P., Camougrand, N., Antonsson, B., Vallette, F. M. et Manon, S. (2003). Investigation of the role of the C-terminus of Bax and of tc-Bid on Bax interaction with yeast mitochondria. *Cell Death Differ* 10, 1068–1077.
- Priault, M., Chaudhuri, B., Clow, A., Camougrand, N. et Manon, S. (1999). Investigation of bax-induced release of cytochrome c from yeast mitochondria permeability of mitochondrial membranes, role of VDAC and ATP requirement. *Eur J Biochem* 260, 684–91.
- Print, C. G., Loveland, K. L., Gibson, L., Meehan, T., Stylianou, A., Wreford, N., de Kretser, D., Metcalf, D., Köntgen, F., Adams, J. M. et Cory, S. (1998). Apoptosis regulator bcl-w is essential for spermatogenesis but appears otherwise redundant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 12424–12431.
- Puthalakath, H., Villunger, A., O'Reilly, L. A., Beaumont, J. G., Coultas, L., Cheney, R. E., Huang, D. C. et Strasser, A. (2001). Bmf : a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science* 293, 1829–1832.
- Ranger, A. M., Zha, J., Harada, H., Datta, S. R., Danial, N. N., Gilmore, A. P., Kutok, J. L., Beau, M. M. L., Greenberg, M. E. et Korsmeyer, S. J. (2003). Bad-deficient mice develop diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci* 100, 9324–9329.
- Roach, H. I. et Clarke, N. M. (2000). Physiological cell death of chondrocytes in vivo is not confined to apoptosis. New observations on the mammalian growth plate. *J Bone Joint Surg Br* 82, 601–613.

- Ross, K., Rudel, T. et Kozjak-Pavlovic, V. (2009). TOM-independent complex formation of Bax and Bak in mammalian mitochondria during TNF $\alpha$ -induced apoptosis. *Cell Death Differ* 16, 697–707.
- Rostovtseva, T. K., Antonsson, B., Suzuki, M., Youle, R. J., Colombini, M. et Bezrukov, S. M. (2004). Bid, but not Bax, regulates VDAC channels. *J Biol Chem* 279, 13575–13583.
- Roucou, X., Prescott, M., Devenish, R. J. et Nagley, P. (2000). A cytochrome c-GFP fusion is not released from mitochondria into the cytoplasm upon expression of Bax in yeast cells. *FEBS Lett* 471, 235–239.
- Samali, A., Holmberg, C. I., Sistonen, L. et Orrenius, S. (1999). Thermotolerance and cell death are distinct cellular responses to stress : dependence on heat shock proteins. *FEBS Lett* 461, 306–310.
- Sattler, M., Liang, H., Nettesheim, D., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Eberstadt, M., Yoon, H. S., Shuker, S. B., Chang, B. S., Minn, A. J., Thompson, C. B. et Fesik, S. W. (1997). Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex : recognition between regulators of apoptosis. *Science* 275, 983–6.
- Savill, J. S., Wyllie, A. H., Henson, J. E., Walport, M. J., Henson, P. M. et Haslett, C. (1989). Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest* 83, 865–875.
- Sax, J. K., Fei, P., Murphy, M. E., Bernhard, E., Korsmeyer, S. J. et El-Deiry, W. S. (2002). BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. *Nat Cell Biol* 4, 842–849.
- Schafer, B., Quispe, J., Choudhary, V., Chipuk, J. E., Ajero, T. G., Du, H., Schneider, R. et Kuwana, T. (2009). Mitochondrial outer membrane proteins assist Bid in Bax-mediated lipidic pore formation. *Mol Biol Cell* 20, 2276–2285.
- Sedlak, T. W., Oltvai, Z. N., Yang, E., Wang, K., Boise, L. H., Thompson, C. B. et Korsmeyer, S. J. (1995). Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7834–8.
- Shan, Y., Liu, T., Su, H., Samsamshariat, A., Mestrl, R. et Wang, P. H. (2003). Hsp10 and Hsp60 modulate Bcl-2 family and mitochondria apoptosis signaling induced by doxorubicin in cardiac muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* 35, 1135–1143.
- Shidoji, Y., Hayashi, K., Komura, S., Ohishi, N. et Yagi, K. (1999). Loss of molecular interaction between cytochrome c and cardiolipin due to lipid peroxidation. *Biochem Biophys Res Commun* 264, 343–347.
- Shimizu, S., Konishi, A., Kodama, T. et Tsujimoto, Y. (2000). BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3100–3105.
- Simbeni, R., Pon, L., Zinser, E., Paltauf, F. et Daum, G. (1991). Mitochondrial membrane contact sites of yeast. Characterization of lipid components and possible involvement in intramitochondrial translocation of phospholipids. *J Biol Chem* 266, 10047–10049.
- Simmons, M. J., Fan, G., Zong, W., Degenhardt, K., White, E. et Gélinas, C. (2008). Bfl-1/A1 functions, similar to Mcl-1, as a selective tBid and Bak antagonist. *Oncogene* 27, 1421–1428.
- Soucie, E. L., Annis, M. G., Sedivy, J., Filmus, J., Leber, B., Andrews, D. W. et Penn, L. Z. (2001). Myc potentiates apoptosis by stimulating Bax activity at the mitochondria. *Mol Cell Biol* 21, 4725–4736.

- Srinivasula, S. M., Gupta, S., Datta, P., Zhang, Z., Hegde, R., Cheong, N., Fernandes-Alnemri, T. et Alnemri, E. S. (2003). Inhibitor of apoptosis proteins are substrates for the mitochondrial serine protease Omi/HtrA2. *J Biol Chem* 278, 31469–31472.
- Staal, S. P. (1987). Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2 : amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 5034–5037.
- Stennicke, H. R., Jürgensmeier, J. M., Shin, H., Deveraux, Q., Wolf, B. B., Yang, X., Zhou, Q., Ellerby, H. M., Ellerby, L. M., Bredesen, D., Green, D. R., Reed, J. C., Froelich, C. J. et Salvesen, G. S. (1998). Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J Biol Chem* 273, 27084–27090.
- Stoka, V., Turk, B., Schendel, S. L., Kim, T. H., Cirman, T., Snipas, S. J., Ellerby, L. M., Bredesen, D., Freeze, H., Abrahamson, M., Bromme, D., Krajewski, S., Reed, J. C., Yin, X. M., Turk, V. et Salvesen, G. S. (2001). Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. *J Biol Chem* 276, 3149–3157.
- Subramanian, C., Opiari, A. W., Bian, X., Castle, V. P. et Kwok, R. P. S. (2005). Ku70 acetylation mediates neuroblastoma cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 4842–4847.
- Sulston, J. E. (1976). Post-embryonic development in the ventral cord of *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 275, 287–297.
- Susin, S. A., Zamzami, N., Castedo, M., Hirsch, T., Marchetti, P., Macho, A., Daugas, E., Geuskens, M. et Kroemer, G. (1996). Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med* 184, 1331–1341.
- Sutton, V. R., Davis, J. E., Cancilla, M., Johnstone, R. W., Ruefli, A. A., Sedelies, K., Browne, K. A. et Trapani, J. A. (2000). Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation. *J Exp Med* 192, 1403–1414.
- Suzuki, M., Youle, R. J. et Tjandra, N. (2000). Structure of Bax : coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* 103, 645–54.
- Szabó, I., Bernardi, P. et Zoratti, M. (1992). Modulation of the mitochondrial megachannel by divalent cations and protons. *J Biol Chem* 267, 2940–2946.
- Taha, T. A., Mullen, T. D. et Obeid, L. M. (2006). A house divided : ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate in programmed cell death. *Biochim Biophys Acta* 1758, 2027–2036.
- Thomas, L. W., Lam, C. et Edwards, S. W. (2010). Mcl-1 ; the molecular regulation of protein function. *FEBS Lett* 584, 2981–2989.
- Thornberry, N. A., Bull, H. G., Calaycay, J. R., Chapman, K. T., Howard, A. D., Kostura, M. J., Miller, D. K., Molineaux, S. M., Weidner, J. R. et Aunins, J. (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 356, 768–774.
- Toyota, H., Yanase, N., Yoshimoto, T., Moriyama, M., Sudo, T. et Mizuguchi, J. (2003). Calpain-induced Bax-cleavage product is a more potent inducer of apoptotic cell death than wild-type Bax. *Cancer Lett* 189, 221–230.
- Tremblais, K., Oliver, L., Juin, P., Cabellec, T. M. L., Meflah, K. et Vallette, F. M. (1999). The C-terminus of bax is not a membrane addressing/anchoring signal. *Biochem Biophys Res Commun* 260, 582–91.

- Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E. et Croce, C. M. (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228, 1440–1443.
- Tsujimoto, Y. et Shimizu, S. (2007). Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. *Apoptosis : An International Journal on Programmed Cell Death* 12, 835–840.
- Uchida, Y., Nardo, A. D., Collins, V., Elias, P. M. et Holleran, W. M. (2003). De novo ceramide synthesis participates in the ultraviolet B irradiation-induced apoptosis in undifferentiated cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 120, 662–669.
- van Loo, G., Schotte, P., van Gurp, M., Demol, H., Hoorelbeke, B., Gevaert, K., Rodriguez, I., Ruiz-Carrillo, A., Vandekerckhove, J., Declercq, W., Beyaert, R. et Vandenabeele, P. (2001). Endonuclease G : a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Differ* 8, 1136–1142.
- Vaux, D. L., Cory, S. et Adams, J. M. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335, 440–442.
- Veis, D. J., Sorenson, C. M., Shutter, J. R. et Korsmeyer, S. J. (1993). Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 75, 229–240.
- Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J. et Vaux, D. L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102, 43–53.
- Villunger, A., Michalak, E. M., Coultas, L., Müllauer, F., Böck, G., Ausserlechner, M. J., Adams, J. M. et Strasser, A. (2003). p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* 302, 1036–1038.
- Vivanco, I. et Sawyers, C. L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase-AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 489–501.
- Vousden, K. H. et Lu, X. (2002). Live or let die : the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2, 594–604.
- Wang, K., Gross, A., Waksman, G. et Korsmeyer, S. J. (1998). Mutagenesis of the BH3 domain of BAX identifies residues critical for dimerization and killing. *Mol Cell Biol* 18, 6083–9.
- Wang, K., Yin, X. M., Chao, D. T., Millman, C. L. et Korsmeyer, S. J. (1996). BID : a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev* 10, 2859–2869.
- Wang, L., Azad, N., Kongkaneramt, L., Chen, F., Lu, Y., Jiang, B. et Rojanasakul, Y. (2008). The Fas death signaling pathway connecting reactive oxygen species generation and FLICE inhibitory protein down-regulation. *J Immunol* 180, 3072–3080.
- Weatherbee, S. D., Behringer, R. R., Rasweiler, J. J. et Niswander, L. A. (2006). Interdigital webbing retention in bat wings illustrates genetic changes underlying amniote limb diversification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 15103–15107.
- Wei, M. C., Lindsten, T., Mootha, V. K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., Thompson, C. B. et Korsmeyer, S. J. (2000). tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev* 14, 2060–2071.
- Weinrauch, Y. et Zychlinsky, A. (1999). The induction of apoptosis by bacterial pathogens. *Annu Rev Microbiol* 53, 155–187.

- Willis, S. N., Chen, L., Dewson, G., Wei, A., Naik, E., Fletcher, J. I., Adams, J. M. et Huang, D. C. S. (2005). Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev* 19, 1294–1305.
- Wilson-Annan, J., O'Reilly, L. A., Crawford, S. A., Hausmann, G., Beaumont, J. G., Parma, L. P., Chen, L., Lackmann, M., Lithgow, T., Hinds, M. G., Day, C. L., Adams, J. M. et Huang, D. C. S. (2003). Proapoptotic BH3-only proteins trigger membrane integration of prosurvival Bcl-w and neutralize its activity. *J Cell Biol* 162, 877–887.
- Wolter, K. G., Hsu, Y., Smith, C. L., Nechushtan, A., Xi, X. et Youle, R. J. (1997). Movement of Bax from the Cytosol to Mitochondria during Apoptosis. *J Cell Biol* 139, 1281–1292.
- Wu, G. S., Burns, T. F., McDonald, E. R., Jiang, W., Meng, R., Krantz, I. D., Kao, G., Gan, D. D., Zhou, J. Y., Muschel, R., Hamilton, S. R., Spinner, N. B., Markowitz, S., Wu, G. et el-Deiry, W. S. (1997). KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat Genet* 17, 141–143.
- Wyllie, A. H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284, 555–556.
- Xin, M. et Deng, X. (2005). Nicotine Inactivation of the Proapoptotic Function of Bax through Phosphorylation. *J Biol Chem* 280, 10781–10789.
- Xin, M. et Deng, X. (2006). Protein phosphatase 2A enhances the proapoptotic function of Bax through dephosphorylation. *J Biol Chem* 281, 18859–18867.
- Xin, M., Gao, F., May, W. S., Flagg, T. et Deng, X. (2007). Protein kinase Czeta abrogates the proapoptotic function of Bax through phosphorylation. *J Biol Chem* 282, 21268–77.
- Xu, Y., Kim, S. O., Li, Y. et Han, J. (2006). Autophagy contributes to caspase-independent macrophage cell death. *J Biol Chem* 281, 19179–19187.
- Yamaguchi, H. et Wang, H. G. (2001). The protein kinase PKB/Akt regulates cell survival and apoptosis by inhibiting Bax conformational change. *Oncogene* 20, 7779–86.
- Yamaguchi, R., Lartigue, L., Perkins, G., Scott, R. T., Dixit, A., Kushnareva, Y., Kuwana, T., Ellisman, M. H. et Newmeyer, D. D. (2008). Opa1-mediated cristae opening is Bax/Bak and BH3 dependent, required for apoptosis, and independent of Bak oligomerization. *Mol Cell* 31, 557–569.
- Yamashima, T. et Oikawa, S. (2009). The role of lysosomal rupture in neuronal death. *Prog Neurobiol* 89, 343–358.
- Yamin, T. T., Ayala, J. M. et Miller, D. K. (1996). Activation of the native 45-kDa precursor form of interleukin-1-converting enzyme. *J Biol Chem* 271, 13273–13282.
- Yan, N., Chai, J., Lee, E. S., Gu, L., Liu, Q., He, J., Wu, J., Kokel, D., Li, H., Hao, Q., Xue, D. et Shi, Y. (2005). Structure of the CED-4-CED-9 complex provides insights into programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 437, 831–837.
- Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L. H., Thompson, C. B. et Korsmeyer, S. J. (1995). Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80, 285–291.

- Yang, Q., Church-Hajduk, R., Ren, J., Newton, M. L. et Du, C. (2003). Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis. *Genes Dev* 17, 1487–1496.
- Yin, X. M., Oltvai, Z. N. et Korsmeyer, S. J. (1994). BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 369, 321–323.
- Yu, J., Zhang, L., Hwang, P. M., Kinzler, K. W. et Vogelstein, B. (2001). PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell* 7, 673–682.
- Yuan, J. et Horvitz, H. R. (1992). The *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-4* encodes a novel protein and is expressed during the period of extensive programmed cell death. *Development* 116, 309–320.
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M. et Horvitz, H. R. (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75, 641–652.
- Yuan, S., Yu, X., Topf, M., Ludtke, S. J., Wang, X. et Akey, C. W. (2010). Structure of an apoptosome-procaspase-9 CARD complex. *Structure* 18, 571–583.
- Zha, H., Aimé-Sempé, C., Sato, T. et Reed, J. C. (1996). Proapoptotic Protein Bax Heterodimerizes with Bcl-2 and Homodimerizes with Bax via a Novel Domain (BH3) Distinct from BH1 and BH2. *J Biol Chem* 271, 7440–7444.
- Zhai, D., Jin, C., Huang, Z., Satterthwait, A. C. et Reed, J. C. (2008). Differential regulation of Bax and Bak by anti-apoptotic Bcl-2 family proteins Bcl-B and Mcl-1. *J Biol Chem* 283, 9580–9586.
- Zhang, H., Cowan-Jacob, S. W., Simonen, M., Greenhalf, W., Heim, J. et Meyhack, B. (2000). Structural basis of BFL-1 for its interaction with BAX and its anti-apoptotic action in mammalian and yeast cells. *J Biol Chem* 275, 11092–11099.
- Zhang, J., Dong, M., Li, L., Fan, Y., Pathre, P., Dong, J., Lou, D., Wells, J. M., Olivares-Villagómez, D., Kaer, L. V., Wang, X. et Xu, M. (2003). Endonuclease G is required for early embryogenesis and normal apoptosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15782–15787.
- Zhang, Z., Zhu, W., Lapolla, S. M., Miao, Y., Shao, Y., Falcone, M., Boreham, D., McFarlane, N., Ding, J., Johnson, A. E., Zhang, X. C., Andrews, D. W. et Lin, J. (2010). Bax forms an oligomer via separate, yet interdependent, surfaces. *J Biol Chem* 285, 17614–17627.
- Zhivotovsky, B. et Orrenius, S. (2010). Cell death mechanisms : cross-talk and role in disease. *Exp Cell Res* 316, 1374–1383.
- Zhong, Q., Gao, W., Du, F. et Wang, X. (2005). Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis. *Cell* 121, 1085–1095.
- Zong, W. X., Edelstein, L. C., Chen, C., Bash, J. et Gélinas, C. (1999). The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis. *Genes Dev* 13, 382–387.
- Zou, H. et Niswander, L. (1996). Requirement for BMP signaling in interdigital apoptosis and scale formation. *Science* 272, 738–741.





# Régulations de la protéine proapoptotique Bax

## rôle des kinases Akt et GSK-3 $\beta$ et de la protéine antiapoptotique Bcl-x<sub>L</sub>

La protéine proapoptotique Bax joue un rôle fondamental au cours de la voie intrinsèque de l'apoptose. Elle participe au déclenchement de la mort en permettant la libération de facteurs apoptogéniques mitochondriaux vers le cytosol. Un des points-clé de la fonction de Bax est son activation, caractérisée par la transition entre une forme cytosolique, globulaire et inactive de la protéine et une conformation mitochondriale, membranaire et active. Les différentes étapes de l'activation de Bax sont relativement bien connues, toutefois un grand nombre de questions reste en suspens quant à leur régulation.

Ce travail s'est focalisé sur la régulation de l'activation de Bax par les kinases Akt et GSK-3 $\beta$  ainsi que par la protéine antiapoptotique Bcl-x<sub>L</sub>. Ces régulations ont été caractérisées en exprimant la protéine Bax humaine chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, un paradigme d'étude simplifié qui permet d'accéder aux composantes individuelles des mécanismes d'activation de Bax.

Les données obtenues suggèrent qu'il existe deux étapes régulées indépendamment au cours de l'activation de Bax. Nous avons montré que la protéine kinase GSK-3 $\beta$  favorise l'adressage de Bax vers la mitochondrie mais qu'elle n'entraîne pas un changement de conformation suffisant à son activation complète et à la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe. Des changements de conformations complémentaires de Bax sont requis pour conduire à une forme capable d'entraîner la libération des facteurs apoptogéniques mitochondriaux. La protéine kinase Akt est impliquée dans le contrôle de Bax *via* la phosphorylation de la sérine 184 et participe à l'inhibition de l'apoptose. Nous avons mis en évidence qu'une mutation phosphomimétique de la sérine 184 ou l'expression d'Akt, en l'absence de partenaires antiapoptotiques, stimulent un changement de conformation de Bax vers une forme active. Akt semble donc plus jouer un rôle sur la conformation de Bax qu'entraîner une inhibition directe. La présence de protéines antiapoptotiques serait ainsi requise pour l'inhibition de Bax en présence d'Akt.

D'autre part, nous nous sommes intéressés aux mécanismes d'action de la protéine antiapoptotique Bcl-x<sub>L</sub>. Nous avons déterminé que Bcl-x<sub>L</sub> pouvait favoriser l'adressage de Bax vers la membrane mitochondriale tout en exerçant un rôle antiapoptotique. Ceci suggère que Bcl-x<sub>L</sub> intervienne dans le contrôle des étapes tardives de l'activation de Bax. Ce contrôle est dépendant d'une interaction stable entre les deux protéines. Inversement, un variant de Bcl-x<sub>L</sub> n'interagissant que de façon transitoire avec Bax (Bcl-x<sub>L</sub> $\Delta$ C) entraîne l'activation de Bax. Cette observation est en faveur d'un modèle d'activation indirecte de Bax consécutive à la rupture de l'interaction avec Bcl-x<sub>L</sub> et dans lequel les protéines à BH3-seulement telles que Bad joueraient un rôle crucial.

---

## Regulations of proapoptotic protein Bax

### role of Akt and GSK-3 $\beta$ kinases and of antiapoptotic protein Bcl-x<sub>L</sub>

Proapoptotic protein Bax plays a major role during apoptosis intrinsic pathway. Bax promotes cell death by inducing the release of apoptogenic factors from mitochondria to cytosol. Bax activation is a key step of its function which involves a change from a globular, cytosolic and inactive conformation to an active mitochondrial, membrane inserted conformation. Bax activation substeps are rather well known, however their regulation remains to be characterized.

This work focuses on the study of the regulation of Bax activation by kinases Akt and GSK-3 $\beta$  and by antiapoptotic protein Bcl-x<sub>L</sub>. Human Bax regulations have been studied by expressing the protein in yeast *Saccharomyces cerevisiae* which represents a simplified paradigm for the understanding of the individual components of Bax activation mechanisms.

Our data suggest that there are two independently regulated steps during Bax activation. We showed that GSK-3 $\beta$  expression led to Bax addressing to mitochondria but was not sufficient to promote a complete activation and mitochondrial outer membrane permeabilization. Further conformational changes are required to promote Bax full activation and the release of mitochondrial apoptotic factors. Protein kinase Akt is involved in Bax activation control through the phosphorylation of serine 184 and contributes to apoptosis inhibition. We observed that either a phosphomimetic mutation of serine 184 or coexpression of Akt, in the absence of antiapoptotic partners, were responsible of Bax conformational change into an active form. By itself Akt did not inhibit Bax but appeared more likely to control its conformational change. Thus, implication of antiapoptotic proteins seems to be critical in a model of Bax inhibition by Akt.

Furthermore, we tried to understand the molecular mechanisms of antiapoptotic protein Bcl-x<sub>L</sub> inhibition on Bax. We determined that Bcl-x<sub>L</sub> could increase Bax mitochondrial localization while leading to its inhibition suggesting that Bcl-x<sub>L</sub> controlled Bax late activation steps. Bax inhibition was dependent on a stable interaction with Bcl-x<sub>L</sub>. Conversely, a variant of Bcl-x<sub>L</sub> having a transitory interaction with Bax (Bcl-x<sub>L</sub> $\Delta$ C) was able to promote Bax activation. This supports a model of Bax indirect activation following the rupture of interaction with Bcl-x<sub>L</sub> in which BH3-only proteins like Bad would play an important role.