

**Université de NANTES**  
**Faculté de Médecine et Pharmacie**

**Mise en évidence d'un marqueur de bon pronostic dans  
le glioblastome multiforme, l'enzyme mPGES-1 ;  
identification de son produit PGE2 comme un nouvel  
activateur direct de la protéine pro-apoptotique Bax.**

**THESE DE DOCTORAT**

**Ecole Doctorale : Chimie Biologie**

**Discipline : Sciences de la vie et de la santé**

**Spécialité : Cancérologie**

*présentée*

*et soutenue publiquement par*

**LALIER Lisenn, Noëlle, Marie**

le 14 novembre 2006, devant le jury ci-dessous

***Président*** Mr MEFLAH Khaled, PU-PH, INSERM U601

***Rapporteurs*** Mme HUEBER Anne-Odile, Chargée de Recherche (HDR), CNRS U724  
Mr WION Didier, Chargé de Recherche, INSERM U318

***Examineurs*** Mr GUILLOUZO André, Professeur d'Université, INSERM U620

Mr MEFLAH Khaled, PU-PH, INSERM U601

Mr MENANTEAU Jean, Chargé de Recherche (HDR), INSERM U601

Mr VALLETTE François, Directeur de Recherche, INSERM U601

***Directeur de thèse : Mr MENANTEAU Jean***

# Sommaire

Sommaire .....	1
Table des figures .....	3
Contexte général.....	5
La voie mitochondriale de l'apoptose.....	8
I Les protéines de la famille de Bcl-2 .....	8
I.1 Les protéines anti-apoptotiques .....	8
I.2 Les protéines pro-apoptotiques à multidomaine .....	10
I.3 Les protéines à BH3-seul .....	11
II Changement de conformation de Bax.....	13
II.1 Conformation active de Bax .....	13
II.2 Rôle potentiel des domaines exposés de Bax .....	14
II.3 Inhibiteurs de Bax.....	16
II.4 Activateurs physiologiques de Bax .....	17
III Perméabilisation mitochondriale.....	18
III.1 Mécanisme de la perméabilisation .....	18
III.2 Relargage de protéines apoptogéniques et conséquences .....	23
Synthèse, catabolisme et sécrétion de PGE <sub>2</sub> .....	26
I Synthèse de PGE <sub>2</sub> .....	26
I.1 Les Phospholipases A <sub>2</sub> .....	26
I.2 Les cyclo-oxygénases .....	30
I.3 Les prostaglandine E <sub>2</sub> synthases .....	37
II Dégradation de PGE <sub>2</sub> .....	42
III Sécrétion de PGE <sub>2</sub> .....	43
III.1 Diffusion passive.....	44
III.2 PGT .....	44
III.3 MOAT .....	45
III.4 MRP .....	45
Voies de signalisation connues de PGE <sub>2</sub> .....	46
I Présentation des récepteurs membranaires aux prostanoides .....	46
I.1 Généralités .....	46
I.2 Voies de signalisation en aval de la protéine G <sub>s</sub> .....	47
I.3 Voies de signalisation en aval de la protéine G <sub>i</sub> .....	47
I.4 Voies de signalisation en aval de la protéine G <sub>q</sub> .....	48
II PGE <sub>2</sub> et pathologie.....	48
II.1 PGE <sub>2</sub> et inflammation.....	49
II.2 PGE <sub>2</sub> et maladies neuro-dégénératives.....	50
II.3 PGE <sub>2</sub> et cancer .....	50
Résultats expérimentaux .....	54
I Rôle de mPGES-1 dans le contrôle de l'apoptose dans le glioblastome .....	54
I.1 Expression de mPGES-1 dans le glioblastome multiforme.....	80
I.2 PGE <sub>2</sub> intracellulaire est pro-apoptotique par sa capacité à activer Bax.....	80
II Rôle de la balance PGE <sub>2</sub> /PGD <sub>2</sub> dans le contrôle de l'apoptose .....	82
II.1 PGD <sub>2</sub> inhibe l'activation de Bax induite par PGE <sub>2</sub> .....	82
II.2 PGD <sub>2</sub> inhibe la mort cellulaire induite par certains autres inducteurs.....	88
III Bases moléculaires de l'activation de Bax par PGE <sub>2</sub> .....	91
III.1 La perméabilisation mitochondriale induite par PGE <sub>2</sub> et Bax n'implique pas l'ouverture du PTP .....	91

III.2 PGE <sub>2</sub> n'induit pas la dimérisation de Bax en l'absence de la membrane mitochondriale.....	93
III.3 PGE <sub>2</sub> induit une modification de la structure de Bax.....	94
IV Bases moléculaires de l'interaction entre PGE <sub>2</sub> et Bax.....	96
IV.1 Epitopes de Bax impliqués dans l'interaction.....	96
IV.2 Rôle de l'hélice $\alpha$ 9 dans l'interaction PGE <sub>2</sub> -Bax.....	99
IV.3 Rôle des cystéines de Bax dans l'interaction.....	100
Discussion.....	103
mPGES-1 et glioblastome mutliforme.....	103
PGE <sub>2</sub> et cancer.....	105
AINS et cancer.....	107
PGE <sub>2</sub> et activation de Bax.....	109
Annexes.....	114
Matériel et méthodes.....	162
Microinjection.....	162
Immunofluorescence.....	162
Cross-linking.....	163
Mutagenèse dirigée.....	163
Méthylation de la matrice.....	164
PCR imparfaite.....	164
Transformation des bactéries.....	164
Transfection des cellules.....	165
Electroporation.....	165
Transfection par agent lipofectant.....	165
Epitope mapping.....	166
Références bibliographiques.....	167

## Table des figures

Figure 1 : les protéines de la famille de Bcl-2 .....	8
Figure 2 : structures résolues en solution des protéines Bcl-x1 et Bcl-2 .....	9
Figure 3 : structure cristalline de Bax en solution .....	11
Figure 4 : modèle de perméabilisation de la membrane externe mitochondriale par l'ouverture du PTP .....	19
Figure 5 : modèle de perméabilisation de la membrane externe mitochondriale par la formation de canaux protéiques. ....	20
Figure 6 : modèle de perméabilisation de la membrane externe mitochondriale par la formation de pores lipidiques toroïdaux.....	21
Figure 7 : formation d'un pore lipidique toroïdal dans une bicouche plane .....	22
Figure 8 : modèle de perméabilisation de la membrane externe mitochondriale par excès de fission mitochondriale. ....	23
Figure 9 : la voie mitochondriale de l'apoptose .....	25
Figure 10 : Représentation d'un phospholipide et site de clivage de la phospholipase A2 .....	29
Figure 11 : Activité catalytique des cyclo-oxygénases .....	30
Figure 12 : voie de synthèse des prostanoïdes .....	41
Figure 13 : voies de signalisation de PGE <sub>2</sub> par l'intermédiaire de ses récepteurs .....	53
Figure 14 : mort induite par la microinjection de PGE <sub>2</sub> dans des cellules de fibroblastes Rat-1. ....	81
Figure 15 : relargage de protéines mitochondriales apoptogéniques par l'action conjointe de PGE <sub>2</sub> et Bax.....	81
Figure 16 : PGD <sub>2</sub> protège les primocultures BeGBM de l'apoptose induite par PGE <sub>2</sub> .....	83
Figure 17 : microinjection de prostaglandines dans la lignée de GBM LN18.....	83
Figure 18 : PGD <sub>2</sub> abroge l'apparition de Bax en conformation active dans les cellules injectées avec PGE <sub>2</sub> .....	84
Figure 19 : effet de PGD <sub>2</sub> sur la translocation mitochondriale de Bax radiomarqué induite par PGE <sub>2</sub> en système acellulaire.....	85
Figure 20 : effet de PGD <sub>2</sub> sur le relargage de protéines mitochondriales apoptogéniques induit par PGE <sub>2</sub> et Bax en système acellulaire. ....	85
Figure 21 : mise en évidence par immuno-précipitation du changement de conformation de Bax radiomarqué induit par les prostaglandines. ....	86
Figure 22 : co-immunoprécipitation de Bax recombinant avec PGE <sub>2</sub> -AChE.....	87
Figure 23 : mise en évidence de l'interaction PGE <sub>2</sub> /Bax par EIA, inhibée par PGD <sub>2</sub> .....	88
Figure 24 : effet protecteur de PGD <sub>2</sub> microinjecté préalablement à différents traitements d'induction d'apoptose. ....	89
Figure 25 : effet de PGD <sub>2</sub> sur l'apoptose induite par la microinjection d'un peptide BH3. ....	89
Figure 26 : dosages de PGE <sub>2</sub> dans des primocultures de GBM traitées à la staurosporine. ....	90
Figure 27 : effet des shRNA dirigés contre COX-2 et L-PGDS dans la sensibilité des GBM à l'apoptose.....	91
Figure 28 : mesure du gonflement mitochondrial en présence de prostaglandines et de Bax. ....	92
Figure 29 : crosslinking sur des lysats cellulaires traités par PGE <sub>2</sub> . ....	93
Figure 30 : crosslinking sur du Bax recombinant tronqué des hélices $\alpha 1$ et $\alpha 9$ .....	94
Figure 31 : immunofluorescence sur des cellules LN18 microinjectées par PGE <sub>2</sub> . ....	95
Figure 32 : sites potentiels d'interaction entre PGE <sub>2</sub> et Bax, étudiés par epitope mapping. ....	96
Figure 33 : représentation des interactions potentielles entre PGE <sub>2</sub> et Bax, pondérées par la force de l'interaction. ....	97

Figure 34 : localisation des sites potentiels d'interaction maximale entre PGE <sub>2</sub> et Bax dans la structure 3D. ....	98
Figure 35 : représentation des sites de disruption de l'interaction PGE <sub>2</sub> /Bax induite par PGD <sub>2</sub> . ....	98
Figure 36 : microinjection de PGE <sub>2</sub> dans des cellules exprimant BaxΔC de manière exogène. ....	99
Figure 37 : rôle de l'hélice α9 dans l'interaction PGE <sub>2</sub> /Bax. ....	100
Figure 38 : sensibilité à l'apoptose des cellules exprimant les mutants de Bax. ....	101
Figure 39 : sensibilité des mutants de Bax à la microinjection de PGE <sub>2</sub> . ....	102

## Contexte général

Le glioblastome multiforme est l'astrocytome de plus haut grade. Parmi les tumeurs cérébrales de l'adulte, les gliomes représentent 70% des tumeurs <sup>1</sup>. Le terme de gliome regroupe les tumeurs cérébrales d'origine non nerveuse que sont les astrocytomes, les oligodendrogliomes (avec des tumeurs mixtes intermédiaires, les oligo-astrocytomes) et les épendymomes, tumeurs nettement plus rares que les deux types précédents. Les astrocytomes sont ensuite classés selon leur grade déterminé en fonction de critères histopathologiques. Le grade IV est appelé glioblastome multiforme, ou GBM.

Les GBM représentent à eux seuls 65% des gliomes. Ils se développent essentiellement chez le patient adulte (âge moyen au diagnostic autour de 60 ans), avec une incidence voisine de 5/100000 habitants en France, pouvant atteindre le double dans certains pays<sup>1</sup>. L'incidence est légèrement supérieure chez les hommes et plus importante parmi la population caucasienne qu'asiatique. Le pronostic du GBM reste dramatique en dépit des progrès faits en matière de diagnostic et de traitement, et la survie à 5 ans est inférieure à 3%.

L'issue de ce type de cancer, toujours fatale à court ou moyen terme, ainsi que la qualité de vie souvent déplorable des patients, font du glioblastome un problème majeur de santé publique en dépit de son incidence relativement faible.

En raison de la longue durée de vie des organismes des Vertébrés, certaines de leurs cellules ont dû développer des capacités répliquatives nécessaires au remplacement des cellules différenciées en fin de vie. Ce phénomène de renouvellement cellulaire est hautement régulé par différents processus biologiques destinés à maintenir l'homéostasie tissulaire. L'apparition d'un cancer requiert l'accumulation de dysfonctionnements multiples de cette régulation. Ainsi, selon Hanahan <sup>2</sup>, la transformation cancéreuse d'une cellule requiert l'acquisition de six propriétés. Elle doit tout d'abord acquérir la capacité à entrer en division en l'absence de facteurs mitogéniques, et malgré la présence de signaux anti-prolifératifs. Ceci s'accompagne de l'apparition d'une capacité de division illimitée permettant l'échappement à la sénescence. La croissance de la tumeur dépend également de la sécrétion par la cellule tumorale de facteurs angiogéniques, permettant la vascularisation tumorale. La cellule transformée possède également un potentiel invasif et métastatique accru, lui permettant de pallier à l'appauvrissement du foyer tumoral initial en espace et en nutriments. Enfin, il est nécessaire à

la cellule de développer des mécanismes de résistance à l'apoptose, mécanisme assurant l'homéostasie tissulaire en compensant dans le tissu sain une prolifération excessive. A ces six caractéristiques, on pourrait rajouter la capacité à échapper au système immunitaire par la sécrétion de cytokines modulant la réponse immunitaire <sup>3-5</sup> (IL-4, IL-10, TGF $\beta$ , VEGF, PGE<sub>2</sub>).

La résistance à l'apoptose est donc une caractéristique fondamentale des cellules tumorales. La plupart des traitements anti-cancéreux met cependant en jeu une partie de la machinerie apoptotique. L'efficacité du traitement dépend donc de l'intégrité de cette machinerie en aval du stimulus représenté par l'agent thérapeutique. Il est donc important de connaître les mécanismes moléculaires mis en oeuvre pour contourner la résistance.

L'apoptose est un processus biologique hautement régulé. La mitochondrie est l'organe central de cette régulation. En effet, au cours de l'apoptose, la perméabilité de la membrane externe mitochondriale est modifiée. Il en résulte un efflux de protéines apoptogéniques vers le cytosol, parmi lesquelles le cytochrome c, SMAC/Diablo, AIF, EndoG, Omi/HtraA2, DDP/TIMM8a <sup>6</sup>. Le cytochrome c participe à la formation d'une structure appelée apoptosome qui permet l'activation de la caspase 9. La perméabilisation est un événement sous le contrôle d'une famille de protéines, la famille de Bcl-2. On compte parmi cette famille des protéines pro-apoptotiques, effectrices de la perméabilisation (e.g. Bax), des protéines anti-apoptotiques, inhibant la perméabilisation induite par les précédentes (e.g. Bcl-2) et des protéines régulant l'activité des protéines des deux groupes précités (e.g. Bid).

Les prostaglandines sont de petites molécules lipidiques dérivées de l'acide arachidonique par l'action coordonnée d'une chaîne enzymatique. Parmi ces enzymes, les cyclo-oxygénases produisent le précurseur PGH<sub>2</sub>. L'une de ces cyclo-oxygénases (COX-2) a la particularité d'être inductible dans la plupart des tissus, à l'exception du système nerveux central où elle est constitutive. Son expression est induite lors de divers processus pathologiques, notamment lors du processus tumoral. Les prostaglandines sont des molécules ubiquitaires, qui agissent par voie autocrine ou paracrine et régulent de nombreux processus physio-pathologiques. Les fonctions qu'elles régulent ainsi que leur mode d'action sont extrêmement variés, grâce à une multiplicité de voies activables par des récepteurs divers, membranaires ou nucléaires.

On distingue quatre prostaglandines primaires : PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>α, PGI<sub>2</sub>, auxquelles s'ajoute le thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), lui aussi dérivé de l'acide arachidonique. La régulation de la production de ces cinq prostanoïdes primaires (et de leur dérivés) permet une régulation très fine de diverses fonctions. Les processus biologiques régulés par les prostaglandines sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Fonction rénale		PGE <sub>2</sub> , PGF <sub>2</sub> α
Motilité et acidité intestinales		PGE <sub>2</sub>
Système nerveux central	cycles éveil-sommeil	PGD <sub>2</sub> , PGE <sub>2</sub>
	transmission de la douleur	PGE <sub>2</sub> , PGI <sub>2</sub>
	température corporelle / fièvre	PGD <sub>2</sub> , PGE <sub>2</sub>
Inflammation / allergie		PGD <sub>2</sub> , PGE <sub>2</sub> , (PGF <sub>2</sub> α), PGI <sub>2</sub> , TXA <sub>2</sub>
Reproduction		PGE <sub>2</sub> , PGF <sub>2</sub> α
Hémostase / vasodilatation		PGD <sub>2</sub> , PGE <sub>2</sub> (+canal artériel), PGI <sub>2</sub> , TXA <sub>2</sub>

Le rôle de deux prostaglandines a été établi dans le développement de tumeurs : PGE<sub>2</sub> et le 15-deoxy-Δ<sup>12-14</sup>PGJ<sub>2</sub>, dérivé de PGD<sub>2</sub>. L'action du 15-deoxy-Δ<sup>12-14</sup>PGJ<sub>2</sub> est médiée par l'activation de facteurs de transcription consécutive à la fixation de la prostaglandine. Quant à PGE<sub>2</sub>, il a été décrit comme agissant par l'intermédiaire de ses récepteurs membranaires EP sur de nombreux facteurs de la progression tumorale (prolifération, angiogenèse, migration, immunotolérance).

L'objectif de ce travail est d'étudier la relation entre PGE<sub>2</sub> et la voie mitochondriale de l'apoptose dans le glioblastome multiforme.

# La voie mitochondriale de l'apoptose

## I Les protéines de la famille de Bcl-2

Les protéines de la famille de Bcl-2 régulent la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale au cours de l'apoptose chez les Mammifères <sup>7</sup>. Ces protéines se caractérisent par des domaines d'homologie avec la protéine Bcl-2, notés BH1-4 (figure 1). A l'exception des protéines à BH3 seul, elles présentent également une forte homologie de structure en dépit d'une faible homologie de séquence globale (20-30%). On distingue 3 groupes au sein de la famille, qui se distinguent par le nombre des domaines d'homologie BH présentés et par la fonction de ces protéines <sup>7</sup>.

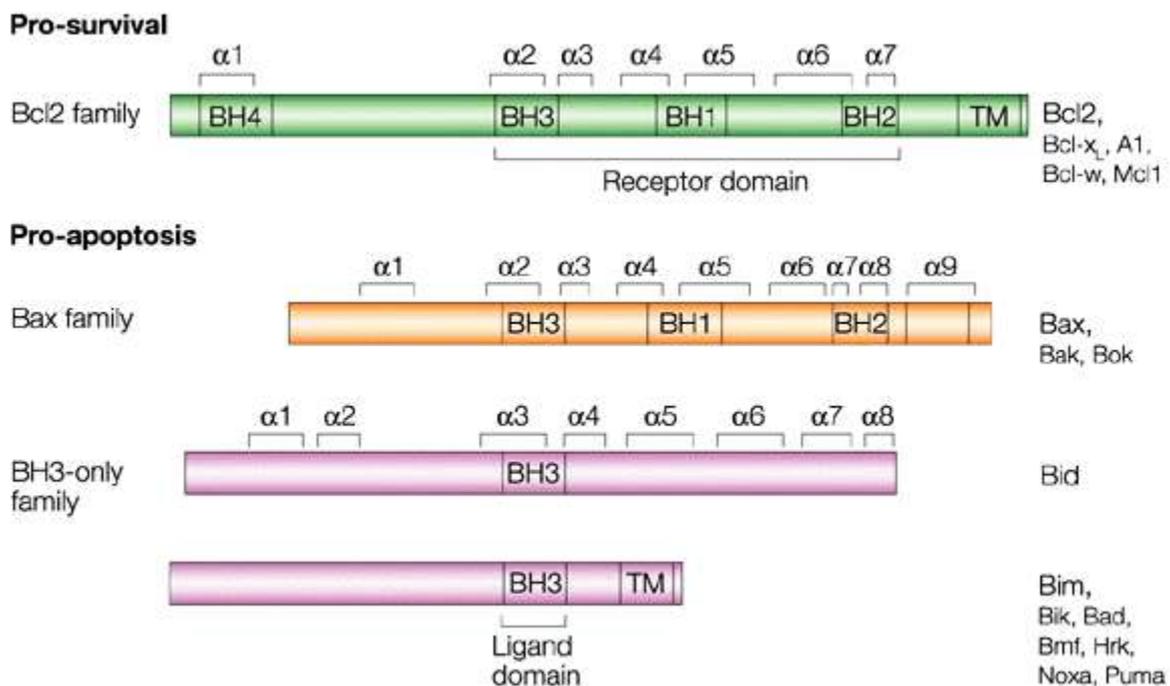


Figure 1 : les protéines de la famille de Bcl-2 (d'après Cory et al.) <sup>7</sup>.

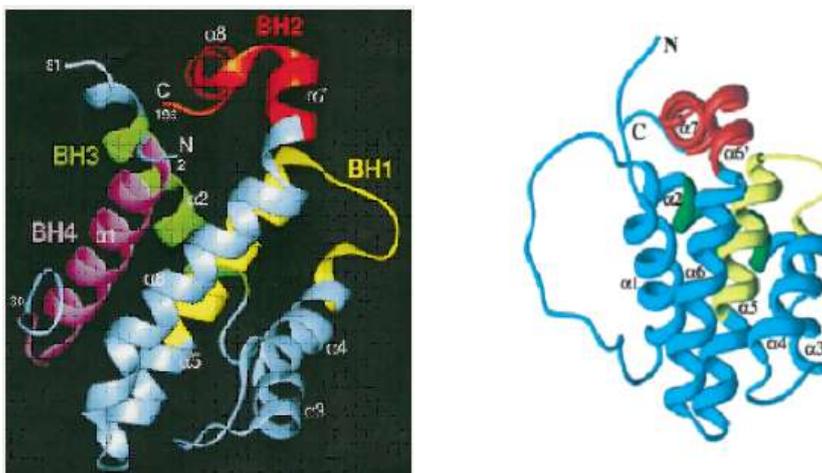
### I.1 Les protéines anti-apoptotiques

Ce groupe, dont fait partie Bcl-2, compte actuellement six représentants chez les Mammifères : Bcl-2, Bcl-x<sub>l</sub>, Mcl-1, Bcl-w, Boo/Diva et A1/Bfl-1. Ces protéines ont une

fonction anti-apoptotique. Elles présentent les 4 domaines d'homologie à Bcl-2 (BH1-4), à l'exception de Mcl-1, dépourvu du BH4, et de Bfl-1, qui ne présente que les domaines BH1 et BH2.

Ces protéines sont les homologues de la protéine anti-apoptotique Ced-9 (*C.elegans*). Elles inhibent la perméabilisation mitochondriale en formant des hétérodimères avec les protéines des deux autres groupes, et en inhibant l'homo-oligomérisation des protéines pro-apoptotiques à multidomaines (cf ci-dessous).

Les structures de Bcl-xl <sup>8</sup>, Bcl-2 <sup>9</sup> et plus récemment Mcl-1 <sup>10</sup> ont été résolues par cristallographie et par RMN (**figure 2**).



**Figure 2 : structures résolues en solution des protéines Bcl-xl et Bcl-2 <sup>8,9</sup>.**

Elles sont extrêmement similaires et décrivent des protéines globulaires, composées de 8 hélices  $\alpha$  séparées par des segments formant des boucles peu structurées, auxquelles se rajoute un segment C-terminal hydrophobe identifié comme une séquence d'ancrage dans les membranes lipidiques. Les hélices centrales  $\alpha 5$  et  $\alpha 6$ , très hydrophobes, sont enfouies au coeur de la protéine et enveloppées par les hélices  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  d'un côté et  $\alpha 7$  et  $\alpha 8$  de l'autre. Ces dernières, amphiphiles, exposent la plupart de leurs résidus hydrophiles au solvant, permettant une solubilité satisfaisante en milieu aqueux. Cependant, dans la cellule, la présence du segment C-terminal hydrophobe permet l'association des protéines aux membranes lipidiques. Ainsi, en conditions viables, Bcl-2 est associé à la mitochondrie et au réticulum. A l'inverse, Bcl-xl est cytosolique dans de nombreux modèles cellulaires en conditions non apoptotiques. Dans cette conformation cytosolique, le segment transmembranaire de Bcl-xl est sequestré dans un sillon hydrophobe présent à la surface de

ces protéines anti-apoptotiques. Durant l'apoptose, le segment C-terminal de Bcl-xl est déplacé de la poche hydrophobe, ce qui induit la translocation de la protéine vers la mitochondrie et le réticulum.

Le sillon hydrophobe des protéines anti-apoptotiques est formé par le repliement des hélices. Sa surface est composée des domaines BH1,2 et 3. Son intégrité est fondamentale dans la fonction des protéines. En effet, il a été montré que cette poche permettait l'hétérodimérisation avec le domaine BH3 des protéines pro-apoptotiques, par une interaction de type récepteur-ligand.

La structure des autres protéines du groupe a été déterminée par modélisation sur la base des structures de Bcl-2 et Bcl-xl et toutes sont supposées avoir des structures très similaires. Ainsi, Bfl-1, dont la séquence ne présente pas les domaines d'homologie BH3 et BH4, possède en N-terminal du BH1 des régions "BH3-like" et "BH4-like", qui adoptent une structure tertiaire similaire à celle des BH3 et BH4 des autres protéines <sup>11</sup>. De même, la structure de Mcl-1 indique la présence d'une hélice  $\alpha$ 1 N-terminale comparable en structure au domaine BH4 de Bcl-xl <sup>10</sup>.

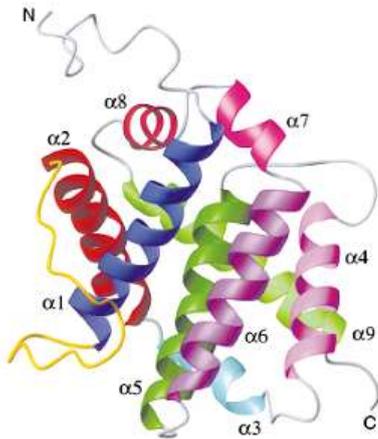
## **I.2 Les protéines pro-apoptotiques à multidomaine**

On classe dans ce groupe les protéines possédant les domaines BH1,2 et 3. Il compte actuellement 3 membres, Bax, Bak et Bok/Mtd. Bok est exprimé spécifiquement dans les organes reproducteurs <sup>12</sup>. En revanche, Bax et Bak sont exprimés de façon ubiquitaire et sont les effecteurs majoritaires de la perméabilisation mitochondriale. Il a été observé dans les cellules cancéreuses que la perte de l'expression de Bax était un facteur dramatique de résistance aux traitements, indiquant un rôle prépondérant de Bax sur Bak dans l'apoptose des cellules cancéreuses.

Bax et Bak sont exprimés de façon constitutive dans les cellules. En conditions non apoptotiques, Bax est cytosolique, alors que Bak est associé à la membrane externe de la mitochondrie. Sous l'effet de stimuli apoptotiques, elles subissent un changement de conformation qui provoque l'exposition de domaines enfouis en conditions natives, notamment le domaine BH3 et les hélices  $\alpha$ 5- $\alpha$ 6, dont le rôle sera discuté plus bas. Ce changement de conformation est responsable d'une insertion des protéines dans la membrane mitochondriale et d'une organisation en oligomères. Ces événements déclenchent la

perméabilisation de la membrane externe mitochondriale et l'activation des caspases, effectrices de l'apoptose. L'activation de Bax et ses conséquences seront décrites ultérieurement.

La conformation de Bax est la mieux connue (**figure 3**). Des expériences de cristallisation<sup>13</sup> ont révélé une structure très semblable à celle de Bcl-xl.



**Figure 3 : structure cristalline de Bax en solution<sup>13</sup>.**

Le coeur hydrophobe de la protéine est constitué des hélices  $\alpha 5$  et  $\alpha 6$ , encadrées par les hélices  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  et  $\alpha 4$  d'un côté et  $\alpha 7$  et  $\alpha 8$  de l'autre. Une dernière hélice  $\alpha 9$  est présente en région C-terminale de la protéine et se loge dans la cavité hydrophobe formée par les domaines BH1, 2 et 3 de la protéine, participant à la stabilisation de la conformation globulaire.

### **I.3 Les protéines à BH3-seul**

Le dernier groupe est constitué de protéines dont la séquence présente uniquement le domaine BH3. Ces protéines sont également nommées BOP (BH3-only proteins)<sup>14</sup>. On compte de nombreux membres dans cette famille, notamment Bid, Bad, Puma, Noxa, Bim, Hrk, BNip3 et BNip3L, Bcl-xs. Bcl-xs a la particularité de posséder aussi un domaine BH4, mais elle se comporte comme une protéine BOP, ce qui justifie son classement dans ce groupe. Ces protéines sont capables d'induire l'apoptose uniquement en présence de l'une au moins des protéines Bax ou Bak.

Les protéines à BH3-seul n'ont pas de structure définie en solution, à l'exception de Bid dont la structure est très comparable à celle des protéines de type Bcl-2 et de type Bax. Leur domaine BH3 est directement exposé. Ceci implique une régulation de leur activité par un mécanisme transcriptionnel ou post-traductionnel. Ainsi, certaines des protéines de ce groupe ne sont pas (ou peu) exprimées en conditions viables mais leur expression est induite sous l'effet de signaux apoptotiques. C'est le cas pour Noxa et Puma dont l'expression est sous le contrôle de p53 et qui sont induites lors de dommages de l'ADN<sup>14</sup>. D'autres sont exprimées constitutivement, mais sont séquestrées loin de leur cible en conditions non apoptotiques (Bad par une protéine 14-3-3, Bim par la chaîne légère de la dynéine) et libérées lors du déclenchement de l'apoptose<sup>14</sup>.

Bid est une exception dans ce groupe : elle est exprimée constitutivement et est soluble dans le cytosol. A l'état latent, la structure de Bid est similaire à celle des protéines à multidomaine et son domaine BH3 est masqué. Sous l'effet de stimuli apoptotiques, Bid est clivée par la caspase 8 ou le granzyme B, libérant respectivement les formes p15-tBid ou p13-tBid. Le clivage de la région N-terminale de Bid induit son changement de conformation, responsable de l'exposition de son domaine BH3. Les deux conformations de tBid ne sont pas strictement équivalentes. Chacune démontre une cible d'activation préférentielle : Bax pour p13-tBid et Bak pour p15-tBid<sup>15</sup>.

Le rôle pro-apoptotique des protéines à BH3-seul est conditionné par leur capacité à interagir avec les autres protéines de la famille par l'intermédiaire de leur BH3. Elles peuvent ainsi se dimériser avec les protéines anti-apoptotiques, leur BH3 interagissant avec la poche hydrophobe des protéines Bcl-2-like. Leur capacité pro-apoptotique pourrait donc en partie s'expliquer par une compétition avec les effecteurs de la perméabilisation Bax et Bak pour la dimérisation avec les protéines de type Bcl-2<sup>16</sup>. Certaines protéines BOP sont capables d'établir une interaction directe avec Bax et de l'activer. Ainsi, il a été montré par Cartron et al.<sup>17</sup> que Puma et la forme p13-tBid pouvaient interagir avec Bax par l'intermédiaire de son hélice  $\alpha 1$  et induire son activation. Inversement, d'autres protéines, comme Bad ou Noxa, ne peuvent activer Bax qu'en présence de protéines de type Bcl-xl. Ces protéines sont en fait capables de dissocier le complexe Bax-Bcl-xl. Cette dissociation a pour effet la libération d'un Bax en conformation active<sup>18</sup>.

Ainsi, les protéines BOP peuvent à nouveau être divisées en deux groupes d'après leur mode d'action. Certaines sont des activateurs directs de Bax (tBid, Puma) alors que d'autres sont des antagonistes des protéines anti-apoptotiques (Bad, Bik/Nbk).

BNip3 et BNip3L sont une exception dans la famille des BOP. En effet, leur domaine BH3 ne semble pas impliqué dans leur capacité à induire l'apoptose. La présence de leur domaine BH3 semble à l'inverse être responsable de l'inhibition de leur fonction pro-apoptotique par les protéines de type Bcl-2 <sup>19</sup>.

## ***II Changement de conformation de Bax***

### **II.1 Conformation active de Bax**

Le changement de conformation de Bax consiste en une dévagination en doigt de gant, les domaines hydrophobes enfouis dans la conformation native de Bax devenant exposés. Ce changement de conformation coïncide avec la translocation de Bax du cytosol vers la membrane externe mitochondriale.

Cette transition conformationnelle peut être reproduite artificiellement par l'utilisation de détergents <sup>12,20</sup> qui déstructurent la poche hydrophobe et déstabilisent totalement la conformation globulaire. Le changement de conformation peut être monitoré par l'utilisation d'anticorps spécifiques d'épitopes particuliers, masqués en conformation native et rendus accessibles aux anticorps en conformation active. L'un des épitopes démasqués lors du changement de conformation est la région N-terminale de l'hélice  $\alpha$ 1, reconnue par l'anticorps 6A7. Dans la conformation active de Bax, le domaine BH3, correspondant à l'hélice  $\alpha$ 2, ainsi que la région N-terminale de l'hélice  $\alpha$ 5, i.e le domaine BH1, deviennent également accessibles à des anticorps spécifiques. Enfin, l'hélice  $\alpha$ 9 de Bax est libérée de la poche hydrophobe déstructurée.

Dans cette conformation active, Bax peut former des homo- ou des hétéro-dimères avec les protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2. Bax activé est transloqué et inséré dans la membrane externe mitochondriale, où il participe à la formation d'oligomères protéiques. La présence de ces oligomères provoque une perméabilisation de la membrane externe mitochondriale, responsable du relargage dans le cytosol de protéines apoptogéniques (cytochrome c <sup>21</sup>, Smac/Diablo <sup>22</sup> et HtrA2/Omi <sup>23</sup>, permettant l'activation des caspases effectrices, TIMM8a participant à la fission mitochondriale <sup>24</sup>, puis AIF <sup>25</sup> et EndoG <sup>21</sup> qui induisent la condensation et la fragmentation de l'ADN).

Certains détergents peuvent modifier la structure de Bax de façon moins drastique<sup>20</sup>. Ainsi, le traitement de Bax par des détergents anioniques ou certains détergent non ioniques induit le démasquage de l'épitope reconnu par l'anticorps 6A7 sans activer Bax. Des travaux plus récents ont confirmé que des stimuli physiologiques (variations physiologiques du pH<sup>26</sup> ou stimulus apoptotique à dose sublétales<sup>27</sup>) produisaient une modification comparable de la conformation de Bax, sans toutefois l'activer. Cette conformation intermédiaire, instable, favorise les interactions de Bax avec d'autres partenaires<sup>26,27</sup>. A ce stade, Bax peut encore revenir à sa conformation native ou bien basculer vers sa conformation active.

## II.2 Rôle potentiel des domaines exposés de Bax

L'étude du changement de conformation de Bax a permis de mettre en évidence différents domaines qui participent à sa fonction pro-apoptotique.

### Hélice $\alpha 1$

L'hélice  $\alpha 1$  de Bax contient une séquence d'adressage mitochondrial<sup>28</sup>. La séquence minimale est représentée par les acides aminés 20-37, *i.e* la région N-terminale de l'hélice  $\alpha 1$ . En amont de cette séquence se trouve une séquence régulatrice, dont l'absence est responsable d'une localisation mitochondriale constitutive de la protéine (Bax $\Delta$ ART<sup>29</sup> et Bax $\Psi$ <sup>30</sup>). La translocation mitochondriale de Bax est inhibée par l'addition d'une chimère entre la séquence d'adressage et la protéine RFP (Aa20-37-RFP). Cette compétition suggère une liaison de type récepteur-ligand entre une protéine mitochondriale et Bax<sup>31</sup>.

La région C-terminale de l'hélice  $\alpha 1$  contient quant à elle une séquence jouant un rôle clé dans l'interaction intra- ou inter-moléculaire de Bax, comme dans l'interaction entre Bax et les domaines BH3 de Bid et de Puma<sup>17</sup>. Cette interaction fait intervenir une liaison électrostatique entre le résidu D33 de l'hélice  $\alpha 1$  et un résidu chargé positivement dans le BH3 du partenaire (K64 pour Bax, R84 pour Bid). La possibilité d'établir cette liaison électrostatique avec Bax pourrait rendre compte de la capacité des protéines BOP à activer directement Bax ou non.

## Hélices $\alpha 5$ - $\alpha 6$

Ces hélices très hydrophobes, qui forment le coeur de la protéine en conformation native, sont disposées en épingle à cheveux dans la conformation active de Bax. De fortes interactions entre les deux hélices stabilisent cette disposition. La structure de ces hélices est semblable à celle d'un domaine porté par les colicines et la toxine diphtérique et responsable de la formation de pores dans les membranes biologiques. Ce domaine de Bax est également susceptible de former des pores dans des membranes lipidiques<sup>32</sup>. Il est responsable de l'insertion de Bax dans la membrane mitochondriale<sup>31,33,34</sup> mais ne joue aucun rôle dans son adressage<sup>31</sup>.

Par similitude avec la formation de pores par les toxines bactériennes, il est envisageable que l'insertion dans la membrane mitochondriale des hélices  $\alpha 5$ - $\alpha 6$  de deux molécules de Bax dimérisées (voire plus) puisse former des pores de taille compatible avec un passage transmembranaire de protéines.

Il est remarquable que d'autres protéines de la famille de Bcl-2 possédant la structure H $\alpha 5$ -H $\alpha 6$  soient capables de former des pores dans des membranes lipidiques en système acellulaire (Bcl-xl<sup>35</sup>, Bcl-2<sup>36</sup>, tBid<sup>37</sup>).

## Hélice $\alpha 9$

L'hélice  $\alpha 9$  de Bax est analogue au segment transmembranaire de Bcl-2 et Bcl-xl. Lorsqu'elle est exposée, elle permet l'association de Bax aux membranes lipidiques, sans critère de sélectivité du type de membrane (réticulum, noyau, mitochondrie). Cette association n'est cependant pas suffisante pour induire la perméabilisation de la membrane mitochondriale.

Le résidu S184 de cette hélice est un élément de régulation de la localisation de Bax. En effet, la présence en cette position d'une charge négative (par mutation<sup>38</sup> ou par phosphorylation de la sérine par AKT<sup>39</sup>) confère à Bax une localisation mitochondriale. A l'inverse, la délétion de cette sérine ou sa mutation en valine induit une localisation constitutivement mitochondriale de Bax, indépendante du déclenchement de l'apoptose<sup>38</sup>.

L'hélice  $\alpha 9$  participe également, avec les hélices  $\alpha 5$ - $\alpha 6$ , à la formation des pores de taille suffisante pour permettre le passage de molécules de grande taille (70kD)<sup>40</sup>. Notamment, l'hélice  $\alpha 9$  est impliquée dans le processus d'oligomérisation de Bax dans les cellules au cours de l'apoptose (Er et al., en préparation).

## Domaine BH3

Le domaine BH3 de Bax est nécessaire et suffisant pour son interaction avec les protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 <sup>41</sup>. Il se lie dans le sillon hydrophobe formé à la surface de ces protéines par les domaines BH1, 2 et 3. Même si la substitution du BH3 de Bax par celui de Bcl-2 n'altère pas l'interaction <sup>42</sup>, plusieurs résidus de Bax apparaissent impliqués dans l'interaction BaxBH3-sillon hydrophobe. Ce rôle a été soit expressément démontré, soit déduit par analogie avec le domaine BH3 de Bak <sup>43,44</sup>. Ainsi, les résidus D68, D71, E69 de Bax établissent des liaisons hydrogène avec les résidus G145, G145 et R146, R107 de Bcl-2 (correspondant aux résidus R139, G138, R100 de Bcl-x1). Parmi ces résidus, D68 et E69 apparaissent comme particulièrement critiques pour la liaison à Bcl-2 <sup>42</sup>. Les résidus hydrophobes de BaxBH3 (K64, I66, L70) établissent des liaisons hydrophobes avec les résidus hydrophobes du sillon dans lequel il s'insère.

## II.3 Inhibiteurs de Bax

### **Protéines inhibant la translocation (Ku70, humanin, 14-3-3θ)**

Il existe des protéines capables de se lier à Bax et de le séquestrer loin de sa cible qu'est la mitochondrie. Dans la cellule, ces protéines séquestrent Bax dans le cytosol.

Notamment, Ku70 se lie à la région N-terminale de Bax par l'intermédiaire de son extrémité C-terminale <sup>45</sup>. Son activité anti-apoptotique est contenue dans un pentapeptide appelé BIP (VPMLK), suffisant pour inhiber l'apoptose Bax-dépendante.

La protéine 14-3-3θ est également capable de se lier à Bax par ses extrémités N- et C-terminales et de le séquestrer dans le cytosol <sup>46</sup>. Cette interaction est disruptée par un mécanisme caspase-dépendant.

Enfin, l'humanin est une très petite protéine capable d'interagir avec Bax et d'inhiber sa translocation <sup>47</sup>. L'humanin possède en outre une fonction anti-apoptotique indépendante de Bax.

### **Protéines inhibant l'oligomérisation (Bcl-2, clusterin)**

Un autre mécanisme inhibiteur de l'activité pro-apoptotique de Bax peut être mis en jeu. En effet, certains inhibiteurs sont capables d'interagir avec Bax dans sa conformation active et d'inhiber son oligomérisation, sans nécessairement prévenir sa localisation mitochondriale. C'est le cas des protéines de type Bcl-2, qui interagissent avec le domaine BH3 de Bax, d'autant mieux que celui-ci est exposé<sup>20</sup>. C'est également le cas de la clusterin, glycoprotéine capable de se lier spécifiquement à la forme activée de Bax à la mitochondrie et d'inhiber son oligomérisation<sup>48</sup>.

## **II.4 Activateurs physiologiques de Bax**

### **Modifications de l'environnement cellulaire (pH, température,...)**

Des modifications physico-chimiques de l'environnement de Bax (pH<sup>49</sup>, température<sup>50</sup>) peuvent induire sa transition conformationnelle. Cependant, lesdites modifications sont difficilement compatibles avec des conditions biologiques. Il paraît plus probable que des modifications plus subtiles, potentiellement cumulables, soient à l'origine de changements discrets dans la structure de Bax. Ceux-ci abaisseraient le seuil d'activation de la protéine et faciliteraient l'interaction de Bax avec ses partenaires.

### **Interaction avec les BOPs**

Certaines protéines à BH3-seul sont des activateurs directs de la protéine Bax. Il a été montré que la liaison de Bax avec p13-tBid ou Puma faisait intervenir la région C-terminale de l'hélice  $\alpha 1$  de Bax et le domaine BH3 de son partenaire<sup>17</sup>. Cette liaison rompt une interaction intramoléculaire entre les résidus D33(H $\alpha$ 1) et K64(BH3) de Bax, probablement par la substitution du résidu R84(BidBH3) au résidu K64 comme partenaire du D33<sup>17</sup>. Une fois Bax activé, tBid est libéré. Cette perte d'affinité suggère que la conformation native de Bax, disloquée lors du changement de conformation, pourrait jouer un rôle dans la stabilisation de l'interaction Bax-Bid, bien que seuls les résidus G94 et M97(BidBH3) aient été identifiés comme nécessaires à cette stabilisation<sup>17</sup>.

### **Disruption de l'interaction avec les protéines anti-apoptotiques**

Le domaine BH3 de Bax se lie au sillon hydrophobe des protéines de type Bcl-2. Certaines molécules sont capables de rompre cette interaction, parmi lesquelles les protéines BOP de type Bad ou un peptide représentant leur domaine BH3<sup>51</sup>. La rupture de l'interaction entre Bax et Bcl-xl par un peptide BadBH3 libère Bax dans sa conformation active<sup>18</sup>. L'interaction entre Bax et Bcl-2 ou Bcl-xl pourrait donc induire ou finaliser le changement de conformation de Bax, qui serait inactivé par un effet de séquestration. Il est à noter en outre que Bcl-2 subit également une modification de sa conformation, associée à la fixation de Bax<sup>52</sup>. La disruption de l'interaction serait alors l'activateur final, autorisant l'accès du Bax activé à sa cible.

## ***III Perméabilisation mitochondriale***

### **III.1 Mécanisme de la perméabilisation**

#### **III.1.1 Rupture de la membrane externe**

L'un des mécanismes de perméabilisation mitochondriale proposés est la rupture non spécifique de la MOM<sup>53,54</sup> (**figure 4**). Cette rupture serait la conséquence du gonflement mitochondrial provoqué par l'ouverture du PTP (pore de perméabilité transitoire), formé notamment par l'association des protéines ANT sur la membrane interne et VDAC sur la membrane externe.

L'ouverture du PTP autorise les échanges d'eau et de petits solutés. Le gonflement mitochondrial induit par l'afflux d'eau provoque la rupture de la MOM par étirement, les protéines de l'espace intermembranaire (dont le cytochrome c) étant alors libérées massivement dans le cytosol. L'ouverture du PTP est associée à un écroulement du potentiel de la membrane mitochondriale interne ( $\Delta\psi_m$ ).

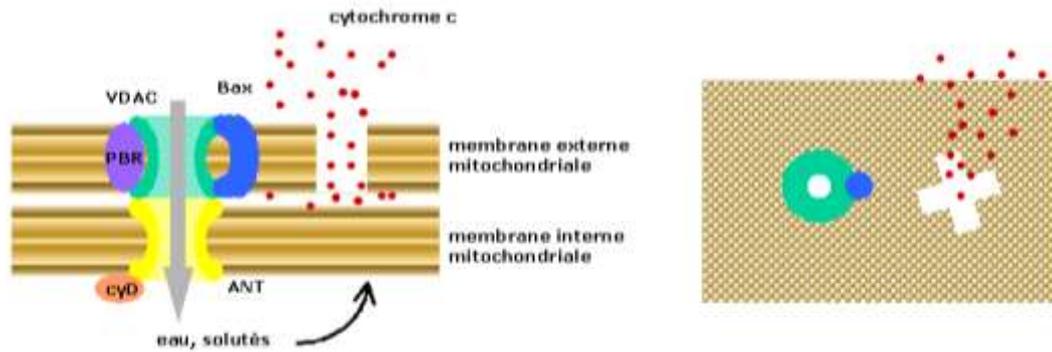


Figure 4 : modèle de perméabilisation de la membrane externe mitochondriale par l'ouverture du PTP.

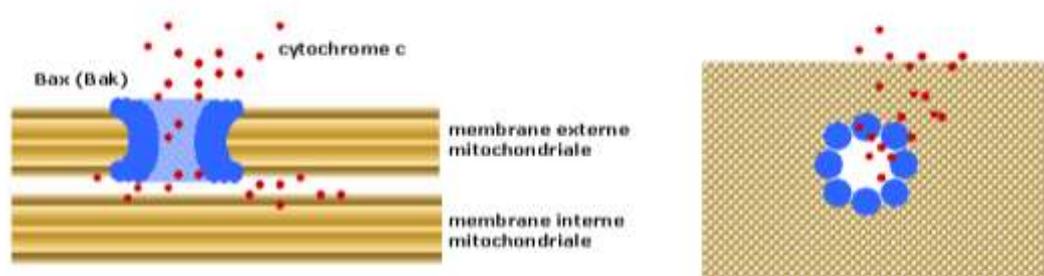
Bax modifierait donc la perméabilité du canal formé par VDAC<sup>55</sup>. Le contact étroit entre VDAC et la protéine ANT, constituant de la membrane interne, serait responsable d'une modification du fonctionnement d'ANT consécutive à celle de VDAC, induisant l'ouverture du PTP. A l'appui de cette hypothèse, des expériences réalisées sur des mitochondries isolées ont montré que Bax induisait une chute du  $\Delta\psi_m$  et un relargage du cytochrome c, ces événements étant inhibés par la cyclosporine A ou des chélateurs d'ions  $Ca^{2+}$ , inhibiteurs du PTP<sup>54</sup>. En outre, l'inhibition du PTP par différents agents (cyclosporine A, acide bongkrétique) permet l'inhibition de l'apoptose dans des lymphocytes T induite par l'injection *in vivo* de dexaméthasone<sup>56</sup>.

Cependant, le relargage de cytochrome c peut également survenir sur des mitochondries conservant leur potentiel de membrane. En outre, le gonflement mitochondrial n'est pas un événement obligatoire de l'apoptose observée *in vivo*. Enfin, les protéines mitochondriales ne sont pas toutes relarguées avec la même cinétique au cours de l'apoptose<sup>57</sup> indiquant que la membrane externe n'est pas rompue initialement.

Il est possible que l'ouverture du PTP soit un phénomène tardif de l'apoptose et ne soit pas nécessaire à la perméabilisation mitochondriale. Il a d'ailleurs été montré dans des cellules traitées par les UV que le relargage du cytochrome c mitochondrial précédait l'écroulement du potentiel de membrane<sup>58</sup>. Il est donc probable que d'autres mécanismes puissent rendre compte de la perméabilisation mitochondriale observée au cours de l'apoptose.

### III.1.2 Ouverture de canaux protéiques spécifiques

Le second modèle de perméabilisation mitochondriale repose sur la capacité de Bax à former des pores dans la membrane externe sans induire sa rupture (**figure 5**). Ces pores seraient formés par l'association des hélices  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  et  $\alpha 9$  de molécules de Bax activées par tBid<sup>40,59</sup>. Reconstitués sur des vésicules mitochondriales isolées, les pores ainsi formés permettent le passage de molécules de 70kD, ce qui est compatible avec la perméabilisation observée. Dans une phase tardive de l'apoptose, probablement postérieure à l'activation des caspases, des oligomères de grande taille, résistants aux conditions réductrices, et composés intégralement ou en partie de molécules de Bax, sont observés à la membrane mitochondriale. Des expériences de patch-clamp ont permis la visualisation d'un canal de grande taille et de forte conductance, inhibé par Bcl-2, appelé MAC<sup>60</sup>. La formation de ce canal MAC est un phénomène tardif *in vivo*<sup>60</sup>, les modifications de Bax consécutives à l'activation des caspases induisant une multimérisation de molécules de Bax à la mitochondrie, s'organisant en mégacanal. Bax et Bak pourraient tous les deux participer à la formation de ce canal<sup>61</sup>.



**Figure 5 : modèle de perméabilisation de la membrane externe mitochondriale par la formation de canaux protéiques.**

Il a également été proposé que Bax puisse s'associer à un canal protéique préexistant et modifier ses propriétés de conductance. Notamment, il a été montré que l'association de Bax avec VDAC pouvait modifier les propriétés électrophysiologiques de ce dernier<sup>62</sup>, autorisant l'efflux de protéines. Bax pourrait donc modifier le fonctionnement de VDAC sans entraîner l'ouverture du PTP.

### III.1.3 Ouverture de canaux lipidiques

Un mécanisme alternatif de perméabilisation mitochondriale a été étudié. Il suggère que l'insertion de Bax dans la membrane externe mitochondriale pourrait conduire à la formation de pores lipidiques toroïdaux, permettant le passage de protéines de l'espace intermembranaire vers le cytosol (**figure 6**).

En système acellulaire, à partir de vésicules lipidiques reconstituées, il a été montré que la courbure de la membrane conditionnait la capacité de Bax à induire la formation de pores, sans modifier son insertion<sup>63</sup>. Ainsi, une proportion élevée de lipides induisant une courbure positive facilite la perméabilisation membranaire induite par Bax, et inversement. De la même façon, Bid a été suggéré comme un facteur facilitant la perméabilisation en transportant vers la membrane externe des lysolipides produits suite à un stimulus apoptotique<sup>64</sup>. L'intégration dans la membrane des lysolipides, ne présentant qu'une seule chaîne carbonée, augmenterait la courbure positive, facilitant la perméabilisation induite par l'insertion de Bax.



**Figure 6 : modèle de perméabilisation de la membrane externe mitochondriale par la formation de pores lipidiques toroïdaux.**

Le modèle de perméabilisation proposée par Garcia-Saez et al.<sup>65</sup> illustre la réorganisation des lipides nécessaire à la formation de pores dans la bicouche plane (**figure 7**).

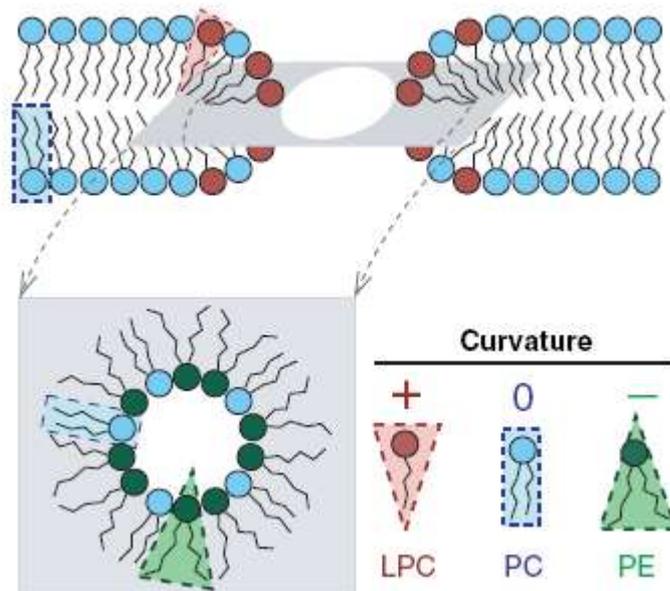
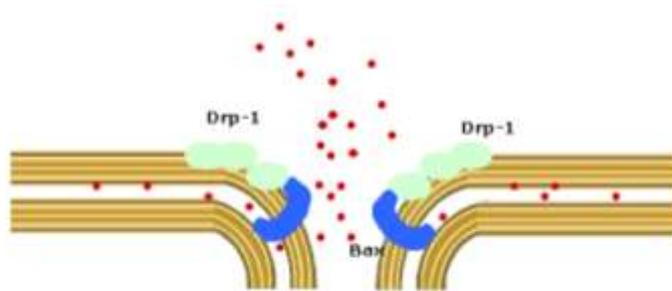


Figure 7 : formation d'un pore lipidique toroïdal dans une bicouche plane <sup>65</sup>.

LPC : lysophosphatidylcholine, PC : phosphatidylcholine, PE : phosphatidyléthanolamine.

### III.1.4 Perturbation de l'équilibre fission/fusion mitochondriale

Physiologiquement, le nombre et la morphologie des mitochondries sont le résultat d'un équilibre entre les mécanismes de fusion et de fission mitochondriales. Il a été observé que la surexpression de Bax dans des cellules induisait une fragmentation du réseau mitochondrial <sup>59,66</sup>. La fragmentation des mitochondries, qui adoptent une morphologie globuleuse, observée au cours de l'apoptose est régulée par la protéine Drp-1 et Bax et s'accompagne de la relocalisation cytosolique du cytochrome c <sup>59</sup>. Il est donc envisageable que la fission mitochondriale participe à l'efflux du cytochrome c libre dans l'espace intermembranaire (**figure 8**).



**Figure 8 : modèle de perméabilisation de la membrane externe mitochondriale par excès de fission mitochondriale.**

Cependant, Arnoult et al. ont montré que la translocation mitochondriale de Drp-1 dépendait de la relocalisation de la protéine mitochondriale Timm8a, et était donc postérieure à la perméabilisation mitochondriale<sup>24</sup>. En outre, la fission mitochondriale physiologique se produit en l'absence du déclenchement de l'apoptose.

Il est donc proposé que l'exacerbation de la fission mitochondriale due à la translocation de Bax ne soit pas un phénomène de perméabilisation direct, mais un facteur sensibilisant la mitochondrie à la perméabilisation induite par Bax, par une augmentation de la courbure moyenne des mitochondries (cf III.1.3)<sup>67</sup>.

## **III.2 Relargage de protéines apoptogéniques et conséquences**

### **III.2.1 Formation de l'apoptosome et activation des caspases**

Lors de la perméabilisation mitochondriale par les protéines Bax et/ou Bak, le cytochrome c présent dans l'espace intermembranaire est libéré dans le cytosol<sup>21</sup>. Il prend alors part à la formation d'un complexe protéique appelé l'apoptosome. L'apoptosome est formé du cytochrome c, de dATP, de la protéine adaptatrice Apaf-1 et de la pro-caspase 9. Une fois formé, ce complexe permet le clivage et l'activation de la pro-caspase 9 en caspase 9. La caspase 9 va à son tour activer les caspases effectrices, notamment la caspase 3. Parmi les cibles de la caspase 3 activée se trouvent CAD (caspase 3 activated DNase), endonucléase dont l'activation est responsable de la dégradation de l'ADN en oligonucléosomes<sup>68</sup>, ainsi que la PARP (polyADP ribose polymerase), inactivée par le clivage.

De façon remarquable, la formation de l'apoptosome nécessite donc la présence de dATP, ce qui implique un fonctionnement préservé de l'activité métabolique de la mitochondrie pour le déclenchement de l'apoptose.

Les cellules expriment une plus ou moins grande quantité d'inhibiteurs de caspases (cIAP, XIAP,...). Conjointement au cytochrome c, deux protéines inhibant ces inhibiteurs (Smac/Diablo <sup>22</sup> et HtrA2/Omi <sup>23</sup>) sont relarguées dans le cytosol, permettant l'activation effective des caspases.

### **III.2.2 Libération des effecteurs nucléaires de l'apoptose**

La perméabilisation mitochondriale permet également la libération cytosolique de deux protéines dont la cible est le noyau : AIF et EndoG. AIF est un facteur responsable de la condensation de la chromatine observée au cours de l'apoptose <sup>25</sup>. Il est transloqué dans le noyau après sa libération de l'espace intermembranaire mitochondrial. De même, EndoG est une endonucléase, responsable comme CAD du clivage ordonné de l'ADN nucléaire <sup>21</sup>. Son activité lytique donne naissance à l'image en "échelle" observée lors de l'électrophorèse de l'ADN de cellules apoptotiques.

### **III.2.3 Efflux de DDP/Timm8a**

Lors du déclenchement de l'apoptose se produit également la translocation cytosolique d'une protéine mitochondriale appelée Timm8a. Elle n'a pas de rôle direct sur l'activation des caspases. En revanche, son interaction avec Drp-1 a été montrée dans le cytosol de cellules apoptotiques <sup>24</sup>. Cette interaction est à l'origine de la translocation de Drp-1 vers la mitochondrie, s'accompagnant d'une fission excessive des mitochondries, participant à l'amplification de la perméabilisation mitochondriale comme décrit ci-dessus (cf III.1.4).

### **III.2.4 Chronologie de l'efflux de protéines mitochondriales**

La perméabilisation de la membrane externe mitochondriale permet donc le relargage dans le cytosol de différentes protéines de l'espace intermembranaire. Ce relargage ne se produit pas selon la même chronologie pour toutes les protéines. Ainsi, Arnoult et al. <sup>57</sup> ont

montré que le relargage du cytochrome c, de Smac/Diablo et de HtrA2/Omi était directement lié à la perméabilisation de la membrane par les protéines Bax/Bak, alors que EndoG et AIF n'étaient libérées de la mitochondrie que dans un deuxième temps, nécessitant l'activation des caspases. La relocalisation de la protéine DDP/Timm8a est également indépendante de l'activation des caspases<sup>24</sup>.

Ainsi, la perméabilisation mitochondriale semble se dérouler en deux étapes (**figure 9**). La première étape est déclenchée par l'activation des protéines pro-apoptotiques Bax/Bak. Leur insertion dans la membrane mitochondriale externe est à l'origine d'un relargage de protéines qui provoquent une amplification du signal : d'une part, l'activation des caspases peut engendrer l'activation d'une plus grande quantité de protéines pro-apoptotiques (clivage de Bid par la caspase 8 et activation consécutive de Bax et Bak, clivage de Bax en p18-Bax) ; d'autre part, la fission mitochondriale sensibilise les mitochondries à la perméabilisation. La deuxième étape aboutit alors à la généralisation de la perméabilisation mitochondriale à l'ensemble des mitochondries et au relargage plus large des protéines mitochondriales, parachevant la déstructuration de la cellule.

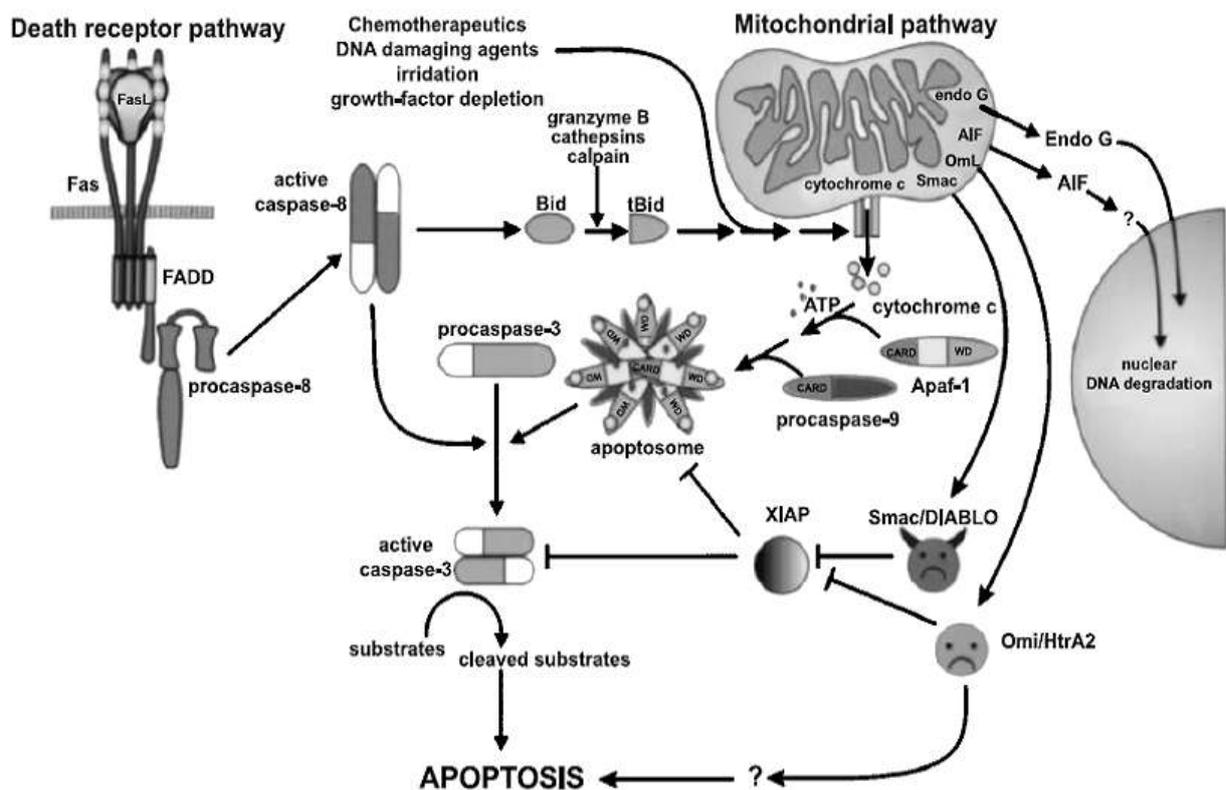


Figure 9 : la voie mitochondriale de l'apoptose<sup>69</sup>.

# Synthèse, catabolisme et sécrétion de PGE<sub>2</sub>

## *I Synthèse de PGE<sub>2</sub>*

PGE<sub>2</sub> est un produit issu de la transformation des phospholipides membranaires par l'action d'une chaîne enzymatique. Les phospholipides membranaires sont hydrolysés par la phospholipase A<sub>2</sub>, libérant de l'acide arachidonique. Deux familles d'enzymes peuvent ensuite modifier l'acide arachidonique : les lipo-oxygénases (5-LOX et 12-LOX, responsables de la synthèse des leucotriènes et du 12-HETE respectivement), et les cyclo-oxygénases (COX-1 et COX-2), responsables de la synthèse des eicosanoïdes (prostaglandines et thromboxanes). La double activité enzymatique des cyclo-oxygénases produit le précurseur des prostaglandines PGH<sub>2</sub>. PGH<sub>2</sub> est ensuite pris en charge par différentes isomérases tissu-spécifiques pour former les différentes prostaglandines primaires (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>α, PGI<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub>).

### **I.1 Les Phospholipases A<sub>2</sub>**

Les phospholipases A<sub>2</sub> sont une famille d'enzymes catalysant l'hydrolyse des phospholipides membranaires <sup>70</sup>. Elles sont codées par 15 gènes distincts chez les Mammifères et sont réparties en 3 classes : les phospholipases sécrétées (sPLA<sub>2</sub>), les phospholipases intracellulaires du groupe VI calcium-indépendantes (iPLA<sub>2</sub>) et les phospholipases cytosoliques du groupe IV (cPLA<sub>2</sub>).

#### **I.1.1 sPLA<sub>2</sub>**

Les phospholipases sécrétées sont des enzymes de petite taille (14-19kDa). Il en existe 10 actuellement dénombrées chez les Mammifères. Leur activité enzymatique requiert la présence d'ions Ca<sup>2+</sup> et n'est pas spécifique de l'acide gras hydrolysé. Après sécrétion, les sPLA<sub>2</sub> hydrolysent les phospholipides des membranes cellulaires externes, l'acide gras libéré pouvant être ensuite recapté par les cellules <sup>71</sup>. Leur site catalytique utilise le doublet His/Asp. Elles sont exprimées chez l'Homme dans les organes lymphoïdes et le tractus digestif.

### **I.1.2 iPLA2**

Les phospholipases intracellulaires du groupe VI sont des enzymes de masse moléculaire supérieure aux sPLA2 (85-90kDa). Il en existe deux isoformes, sans compter de nombreux variants d'épissage. L'activité enzymatique des iPLA2 n'est pas dépendante du calcium, bien qu'elle ait été décrite comme accrue en présence de calcium dans certains modèles cellulaires. Les iPLA2 jouent un rôle dans le remodelage des phospholipides et les réparations membranaires et ne sont pas spécifiques de l'acide gras porté en sn-2. Leur site catalytique utilise une triade Ser/His/Asp. Elles sont exprimées de façon ubiquitaire dans la plupart des cellules et des tissus.

### **I.1.3 cPLA2**

Les phospholipases cytosoliques du groupe IV existent sous trois isoformes. Elles sont de grande taille (85-110kDa) et sont faiblement calcium-dépendantes. Leur site catalytique utilise un doublet Ser/Asp. Elles sont exprimées de façon ubiquitaire, avec des taux d'ARNm particulièrement élevés chez l'Homme dans le cerveau, le poumon, les reins, le coeur, la rate, le placenta et le pancréas <sup>72</sup>.

Toutes ces phospholipases A2 sont capables de libérer de l'acide arachidonique. Cependant, la libération d'acide arachidonique, nécessaire à la synthèse des eicosanoïdes (prostaglandines et thromboxanes), semble être l'activité principale d'une seule d'entre-elles : la phospholipase cPLA2 $\alpha$ . Celle-ci est particulièrement spécifique de la liaison sn-2 de l'acide arachidonique sur les phospholipides.

La transcription du gène codant pour la cPLA2 $\alpha$  humaine est sous le contrôle d'une région promotrice présentant de nombreux sites de fixation potentiels d'éléments régulateurs <sup>72</sup>. On trouve ainsi plusieurs sites AP-1, AP-2, NF- $\kappa$ B, NF-IL-6, PEA3, C/CEBP (CCAAT-enhancer binding protein) et GRE (glucocorticoïd response element). Elle est en revanche dépourvue de TATA box, caractéristique commune à beaucoup de promoteurs de gènes de ménage, mais aussi de site SP1, classiquement présent sur les gènes de ménage. La

transcription de cPLA2 $\alpha$  est stimulée par de nombreuses cytokines parmi lesquels IL-1, TNF $\alpha$ , CSF, EGF, IFN- $\gamma$ . Cette transcription se traduit par un relargage prolongé d'acide arachidonique, et par la synthèse consécutive d'eicosanoïdes.

L'activité de l'enzyme est également régulée par des mécanismes post-transcriptionnels, notamment la phosphorylation de la protéine. La protéine comporte en effet de nombreux sites de phosphorylation pour des sérine/thréonine kinases et des tyrosine kinases. Parmi ces sites, deux sérines sont conservées dans différentes espèces et constamment phosphorylées quel que soit le stimulus considéré : les sérines 505 et 727<sup>72</sup>. La sérine 505 est phosphorylée par une MAPkinase (ERK ou p38) et cette phosphorylation accroît considérablement l'activité catalytique de l'enzyme et la libération d'acide arachidonique. L'importance de Ser505 pour l'activité de l'enzyme s'explique par la position de ce résidu à proximité du site catalytique. Cette activité reste cependant inféodée à une élévation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire (cependant inférieure à la quantité de Ca<sup>2+</sup> nécessaire à l'activité des sPLA2 Ca<sup>2+</sup>-dépendantes), responsable de la liaison de l'enzyme aux membranes. Les kinases PKC et PKA sont capables de phosphoryler Ser 727, phosphorylation dont l'importance a été démontrée dans divers types cellulaires. Pourtant, elle n'induit pas d'augmentation significative de l'activité de l'enzyme. Il a été proposé que la phosphorylation de Ser727 puisse induire l'association de cPLA2a aux membranes de façon Ca<sup>2+</sup>-indépendante, sans que la réalité physiologique de cette hypothèse n'ait pu être vérifiée. Il est à noter que l'activation de PKC peut induire une cascade de phosphorylation aboutissant à l'activation des MAPkinases. Il est donc possible que la phosphorylation de Ser727 soit un événement concomittant, induit en amont de celle de Ser505.

cPLA2 $\alpha$  est une enzyme cytosolique ou péri-membranaire<sup>72</sup>. Une élévation du calcium intracellulaire peut induire sa translocation vers les membranes (Golgi, réticulum endoplasmique et membrane nucléaire), due à la fixation du calcium sur l'extrémité N-terminale du domaine C2 de l'enzyme permettant l'interaction de l'enzyme avec son substrat. Le domaine C2 de l'enzyme isolé est en effet capable de se lier aux membranes en présence de calcium, alors que l'enzyme dépourvue de son domaine C2 conserve son activité catalytique uniquement sur des phospholipides monomériques<sup>72</sup>.

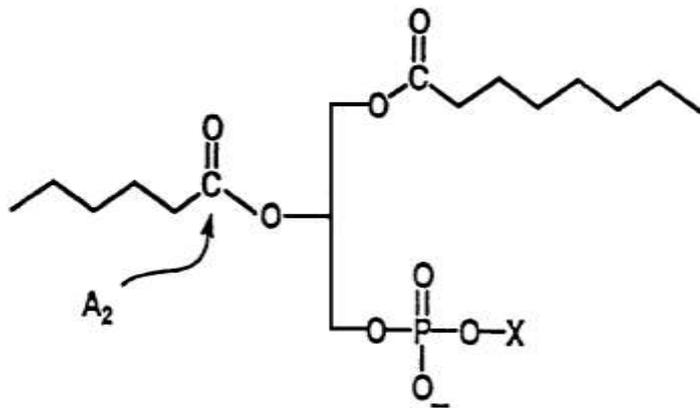


Figure 10 : Représentation d'un phospholipide et site de clivage de la phospholipase A2 <sup>71</sup>.

L'activité catalytique de cPLA2 $\alpha$  est fortement spécifique de la liaison sn-2 des phospholipides arachidoniques (**figure 10**). A l'inverse, l'enzyme est peu spécifique du groupement polaire en sn-3 ou de l'acide gras en sn-1 <sup>72</sup>. L'activité catalytique est fortement dépendante de la présence dans le site catalytique de trois résidus-clés : Arg220, Ser228 et Asp549. Le résidu Ser228 est le site actif nucléophile responsable de la rupture de la liaison ester sn-2. Asp549 participe à cette réaction en attirant un proton à lui. Le rôle du troisième résidu Arg220 reste plus obscur, bien qu'il soit avéré.

Pour comprendre le rôle physiopathologique de cPLA2 $\alpha$ , des expériences ont été réalisées sur des souris invalidées pour le gène cPLA2 $\alpha$ . Ces souris présentent moins de lésions cérébrales (oedème cérébral, déficits neurologiques) lors d'ischémie cérébrale transitoire, indiquant un rôle important de cPLA2 $\alpha$  dans la mort neuronale induite par l'ischémie <sup>72</sup>. Différents travaux ont également montré que les souris déficientes en cPLA2 $\alpha$  présentaient une diminution de la synthèse d'eicosanoïdes ainsi que des symptômes associés à une déficience en PGE<sub>2</sub> (fécondité altérée, déficit d'aggrégation plaquettaire, réponse amoindrie à l'induction de l'arthrite par le collagène) (cf Park et al <sup>73</sup> pour revue).

cPLA2 $\alpha$  apparaît donc comme une enzyme-clé dans la synthèse de PGE<sub>2</sub>.

## I.2 Les cyclo-oxygénases

Les cyclo-oxygénases sont les enzymes catalysant la première étape de la synthèse des eicosanoïdes (**figure 11**). Elles portent également le nom de prostaglandine endoperoxyde H synthase.

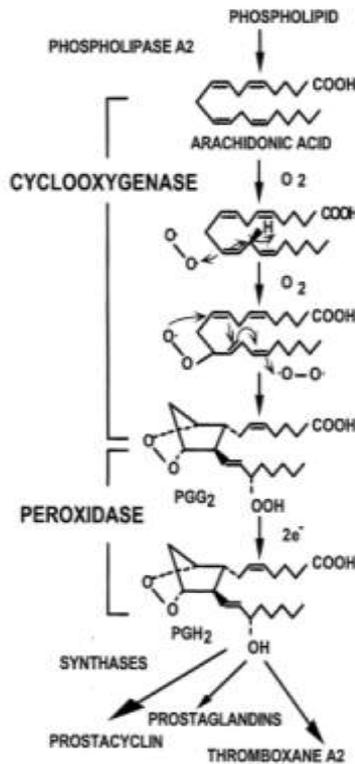


Figure 11 : Activité catalytique des cyclo-oxygénases <sup>74</sup>.

On connaît deux isoformes majeures des cyclo-oxygénases, COX-1 et COX-2. Une troisième isoforme, COX-3, a été identifiée en 2002 mais son rôle reste actuellement discuté.

### I.2.1 COX-1

COX-1 est une enzyme de 70kDa. Le gène codant pour cette enzyme se trouve sur le chromosome 9 (locus 9q32-q33.3). La région promotrice de ce gène comporte des sites AP-2, des motifs Sp1 et NF-IL6, une boîte GATA. Elle ne présente en revanche ni boîte TATA ni

boîte CAAT et est riche en GC. Ce profil fait de COX-1 une enzyme exprimée de façon constitutive dans la plupart des cellules. COX-1 est ainsi impliquée dans la synthèse basale des prostaglandines, participant au maintien de l'homéostasie tissulaire. Son expression peut cependant être stimulée dans certaines cellules par divers inducteurs <sup>75</sup> (TPA, TGF $\beta$ , VEGF, IL-1 $\beta$ , acide rétinoïque, estradiol-17 $\beta$ ).

A l'intérieur de la cellule, il a été montré que COX-1 était associée également à la membrane nucléaire et au réticulum endoplasmique.

## **I.2.2 COX-2**

### ***I.2.2.1 Description :***

COX-2 est elle aussi une protéine de 72kDa, codée par un gène porté par le chromosome 1 (locus 1q25.2-25.3). A l'inverse de celle de COX-1, la région promotrice de COX-2 comporte de nombreux éléments régulateurs : en plus des motifs Sp1, NF-IL6, AP-2 déjà présents sur COX-1, on trouve une TATA-box et une E-box, un motif CRE et deux sites NF- $\kappa$ B. En effet, COX-2 n'est pas exprimée dans la plupart des tissus (à l'exception du système nerveux central où elle est constitutive), mais elle est fortement induite sous l'effet de stimuli, notamment lors de processus inflammatoires <sup>75</sup>.

Comme celle de COX-1, sa localisation cellulaire est essentiellement membranaire (noyau et réticulum endoplasmique).

### ***I.2.2.2 Voies de régulation :***

De nombreux stimuli peuvent induire l'expression de COX-2 : facteurs pro-inflammatoires (IL-1 $\alpha$  et  $\beta$ , TNF $\alpha$  et  $\beta$ , INF $\gamma$ , LPS, TPA), hormones (FSH, LH, estrogène), facteurs de croissance (EGF, PDGF, FGF), oncogènes (v-Src, v-Ras), neurotransmetteurs (NMDA) <sup>75,76</sup>. Il est à noter que l'induction de l'expression de COX-2 par le LPS est dépendante de l'activité des phospholipases cPLA2 et sPLA2 <sup>77</sup>.

Ces stimuli activent différentes voies de signalisation, parfois croisées. Une voie majeure de l'activation de l'expression de COX-2 est celle des MAPK (mitogen-activated

protein kinases), notamment les voies ERK1/2, JNK et p38. L'autre voie de signalisation majeure responsable de l'expression de COX-2 est la voie NF- $\kappa$ B, par l'intermédiaire de la phosphorylation et de l'inactivation de son inhibiteur I $\kappa$ B.

### I.2.3 Activité catalytique de COX-1 et COX-2

Bien que codées par des gènes distincts, COX-1 et COX-2 possèdent une grande homologie de structure. Leurs séquences protéiques sont homologues à 61% et leurs structures cristallines sont quasiment identiques<sup>73</sup>. Ces enzymes ont une activité catalytique double : elles sont à la fois cyclo-oxygénases et peroxydases.

COX-1 et COX-2 existent sous forme d'homodimères liant 1 mole d'hème ferrique par mole de monomère<sup>78</sup>. Chaque monomère comporte trois domaines : un motif N-terminal EGF (epidermal growth factor)-like, un domaine MBD (membrane-binding domain) composé de quatre hélices amphiphiles, formant l'entrée du site actif cyclo-oxygénase, et un domaine catalytique double, comprenant les sites cyclo-oxygénase (COX) et peroxydase (POX).

L'étape d'oxygénation a lieu dans un canal formé au sein de la protéine, alors que l'étape de réduction se produit plus en surface du complexe, à proximité de l'hème. COX-1 et -2 lient l'acide arachidonique au niveau du site COX, où 2 molécules d'oxygène se lient à l'acide arachidonique pour former l'intermédiaire bicyclique PGG<sub>2</sub>. PGG<sub>2</sub> migre ensuite vers le site POX de l'enzyme, plus en surface de la protéine, où il est réduit en PGH<sub>2</sub>.

Bien que les sites COX des 2 enzymes diffèrent en taille (celui de COX-2 est plus large), leur affinité pour l'acide arachidonique est similaire<sup>73,74</sup>. Malgré cette même affinité, il semble que la concentration optimale de substrat soit différente pour chacune des 2 enzymes : COX-2 métabolise préférentiellement l'acide arachidonique lorsqu'il est en concentration faible ( $\leq 2,5\mu\text{M}$ ), alors que c'est COX-1 qui l'oxyde préférentiellement lorsque sa concentration devient forte ( $>10\mu\text{M}$ ). Cette observation s'accorde avec la cinétique de mise en oeuvre de ces deux enzymes au cours de la réaction inflammatoire : COX-1 intervient en phase précoce de l'inflammation (10-30 premières minutes, lorsque l'acide arachidonique est libéré en grande quantité), puis COX-2 est induite et prend le relais de la synthèse de prostaglandines lorsque les concentrations d'acide arachidonique diminuent (2-12h)<sup>74</sup>.

### **I.2.4 COX-3**

Depuis plusieurs années, il a été postulé l'existence d'une troisième isoforme de cyclo-oxygénase. En effet, dès 2000, deux équipes publient des éléments suggérant l'existence d'une troisième enzyme <sup>79,80</sup>. Ces deux équipes soulignent l'incapacité à expliquer la résolution de phénomènes inflammatoires <sup>80</sup> ainsi que le mode d'action du paracétamol <sup>79</sup> par la seule existence de COX-1 et -2. Toutes deux postulent donc l'existence de COX-3 comme une nouvelle isoforme de COX-2, plus courte et cytosolique.

En 2002, Chandrasekharan et al. <sup>81</sup> ont cloné et identifié dans du cortex cérébral de chien une protéine, nommée COX-3, codée par le gène de COX-1. Cette protéine provient d'un ARNm présentant une rétention de l'intron 1 du gène COX-1, ainsi qu'un décalage du cadre de lecture résultant en une protéine tronquée. C'est une enzyme possédant une activité cyclo-oxygénase, inhibée par les AINS, membranaire mais localisée dans la lumière du réticulum endoplasmique et du noyau. L'expression de cette isoforme de COX-1 (ainsi que d'autres protéines dérivées de COX-1, plus courtes et dénuées d'activité enzymatique), a été mise en évidence chez l'Homme, en particulier dans le cortex cérébral et le cœur.

Cependant, si la mise en évidence d'une COX-3 a initialement été considérée comme la promesse d'une nouvelle cible thérapeutique, ou comme une clé dans la compréhension des mécanismes de résolution des processus inflammatoires ainsi que des mécanismes d'action des AINS, ces espoirs ont été quelque peu déçus. En effet, les travaux de Qin et al. <sup>82</sup> ont montré que la forme humaine de COX-3 était capable de synthétiser  $\text{PGF}_2\alpha$ , mais avec une efficacité bien moindre que celle de COX-1. D'autre part, aucune différence de sensibilité à différents AINS testés n'a été observée entre ces deux variants, rendant impossible le ciblage pharmaceutique de l'un ou l'autre, tout du moins par l'une des molécules existant à ce jour.

### **I.2.5 Inhibiteurs de COX**

Les inhibiteurs de COX, ou anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), sont utilisés de longue date en clinique, l'ancêtre de toutes les molécules connues étant l'aspirine. De nombreuses molécules existent actuellement. Leur action s'exerce par la fixation dans le site

catalytique COX, en compétition simple avec le substrat de l'enzyme (inhibition réversible) ou en modifiant le site catalytique suite à sa fixation (inhibition irréversible, dépendante du temps) <sup>78</sup>.

Les sites catalytiques de COX-1 et COX-2, bien que très similaires, présentent quelques différences, qui ont permis le développement d'inhibiteurs spécifiques de COX-2. Les deux enzymes possèdent une arginine en position 120. Celle-ci semble cruciale pour l'inhibition de COX-1 par les AINS acides non sélectifs (aspirine, indométhacine, flurbiprofène, kétoprofène entre autres). En outre, les quelques inhibiteurs sélectifs de COX-2 dépourvus de fonction carboxylique acide (Dup-697 et L-746-483) sont 10 fois plus efficaces sur le mutant R120E de COX-1 que sur la forme native de l'enzyme <sup>78</sup>. A l'inverse, le rôle joué par Arg120 dans la fixation de nombreux AINS sur COX-2 semble plus accessoire. Ceci pourrait être dû à la taille du site COX-2, plus large, rendant moins stringentes les contraintes stériques et réduisant par ce biais l'importance des interactions ioniques avec Arg120.

Garavito a montré que la substitution sur COX-2, par rapport à COX-1, de deux résidus isoleucine (Ile434 et Ile523) par deux résidus valine permettait la création d'une poche accessoire, voisine du site actif de l'enzyme, autorisant la fixation de molécules plus volumineuses <sup>78</sup>. Cette différence de taille est la première caractéristique permettant la sélectivité de certains AINS pour COX-2.

Par ailleurs, la présence dans le fond de cette poche accessoire de COX-2 d'un résidu arginine (au lieu d'une histidine sur COX-1) est nécessaire à la fonction inhibitrice, dépendante du temps, des inhibiteurs de COX-2 <sup>78</sup>. Pour certains inhibiteurs, l'interaction avec cette charge positive est nécessaire à leur fonction. D'autres n'interagissent pas directement avec l'arginine ; à l'inverse, ils induisent la formation de liens hydrogène entre l'Arg513 et des résidus voisins (Glu524 et Tyr355). Cette perturbation de la conformation du site semble suffisante pour inhiber l'interaction de l'enzyme avec son substrat de façon quasi-irréversible.

Ainsi, de nombreuses recherches ont été menées pour mettre au point des inhibiteurs de COX qui permettent de résoudre les processus pathologiques (inflammatoires et tumoraux) dans lesquels ces enzymes sont impliquées, en minimisant les effets secondaires dus à l'inhibition de l'activité physiologique des cyclo-oxygénases. Malgré de nombreux progrès dans la spécificité des inhibiteurs actuels, ces molécules conservent des effets secondaires majeurs et parfois inexplicables, qui rendent leur utilisation à long terme délicate et difficilement applicable notamment à la prévention de certains cancers.

L'inhibition de l'activité cyclo-oxygénase induit, outre la diminution des prostaglandines synthétisées, l'accumulation d'acide arachidonique libre. Il a été montré que cette accumulation participait à l'inhibition de la tumorigenèse colique en stimulant la conversion de la sphingomyéline en céramide, médiateur de l'apoptose <sup>83</sup>.

### I.2.6 Phénotype de la déficience en COX

Le rôle de des cyclo-oxygénases dans la physiologie et dans certaines pathologies a pu être visualisé par l'étude du phénotype de souris déficientes en l'une, l'autre, voire les deux cyclo-oxygénases. Ces données sont résumées dans une revue de Loftin et al. publiée en 2002 <sup>84</sup>. La première information apportée par l'obtention d'animaux déficients en COX-1 ou COX-2 est qu'ils sont viables, suggérant une compensation partielle d'une enzyme par l'autre. En revanche, si la proportion des différents génotypes obtenus est conforme aux lois de Mendel également lors des croisements de souris COX-1<sup>-/-</sup>/COX-2<sup>-/-</sup>, les souris double-déficientes meurent au cours de la première journée de détresse respiratoire due à un défaut d'obturation du canal artériel. Les différentes anomalies observées chez les animaux simple-déficients sont regroupées dans le tableau ci-dessous.

Processus physiopathologique	souris COX-1 <sup>-/-</sup>	souris COX-2 <sup>-/-</sup>
mortalité néonatale	normal	augmenté
mortalité de l'adulte	normal	augmenté
ulcération gastrique spontanée	normal	normal
canal artériel persistant	normal	augmenté
développement rénal post-natal	normal	altéré
ovulation	normal	altéré
implantation	normal	altéré
parturition	retardé	(inconnu)
cicatrisation	(inconnu)	altéré
aggrégation plaquettaire	altéré	normal
développement de tumeurs intestinales	diminué	diminué
inflammation	altéré	altéré

incidence de péritonite	normal	augmenté
synthèse de PG constitutive	diminué	normal
synthèse de PG inductible	normal	diminué
arthrite auto-immune	normal	diminué
résorption osseuse	normal	diminué
hématopoïèse induite	(inconnu)	diminué
survie des cellules souches intestinales	diminué	normal
réponse fébrile	normal	diminué
inflammation colique	augmenté	augmenté
flux sanguin cérébral induit	normal	diminué
flux sanguin cérébral basal	diminué	(inconnu)
lésions ischémiques cérébrales	(inconnu)	diminué
lésions d'ischémie/reperfusion	augmenté	augmenté

Ce tableau permet de distinguer des processus dans lesquels une seule des deux enzymes est impliquée, dans lesquels des phénomènes de compensation existent, et des phénomènes dans lesquels la fonctionnalité des deux enzymes est nécessaire.

Il apparaît que COX-1 est l'enzyme responsable de la synthèse basale des prostaglandines, alors que COX-2 intervient dans la synthèse inductible des prostaglandines. Pourtant, l'incidence de l'ulcération gastrique, symptôme fréquemment associé à l'exposition prolongée aux AINS non spécifiques et imputé à l'inhibition de COX-1, n'augmente pas chez les souris COX-1<sup>-/-</sup>. Cette observation indique que ce n'est pas l'inhibition de COX-1, mais celle des deux enzymes par les inhibiteurs non spécifiques, qui induit l'ulcération gastrique à long terme.

COX-1 et COX-2 participent toutes les deux aux processus inflammatoires et tumoraux, à l'exception des inflammations auto-immunes, des péritonites et de la réaction fébrile dans lesquelles seule la déficience en COX-2 a un impact.

Enfin, COX-2 semble être l'enzyme impliquée dans le contrôle des fonctions reproductrices femelles, à l'exception de la parturition, dépendante de COX-1.

### I.3 Les prostaglandine E<sub>2</sub> synthases

A l'inverse des cyclo-oxygénases, les données moléculaires concernant les PGE<sub>2</sub> synthases sont connues depuis peu. A ce jour, trois types de PGES ont été identifiées.

#### I.3.1 mPGES-1

En 1999, l'équipe de P.J. Jakobsson identifie une enzyme de 16kDa possédant une activité de synthèse élevée de PGE<sub>2</sub> à partir de PGH<sub>2</sub> en présence de glutathion (GSH) <sup>85</sup>.

Cette protéine a été précédemment décrite comme MGST1-L1 (microsomal glutathione S-transferase 1-like 1, GenBank R76492, P.J. Jakobsson et al) et comme PIG12 (p53-induced gene 12) <sup>86</sup>. Elle est codée par un gène porté par le chromosome 9 (locus 9q34.3), divisé en 3 exons.

mPGES-1 appartient à la famille des MAPEG (membrane-associated proteins involved in eicosanoid and glutathione metabolism), avec une forte homologie de séquence avec les MAPEG du groupe I (dont MGST-1) <sup>87</sup>. La séquence de mPGES-1 est très conservée parmi les Mammifères chez lesquels elle a été identifiée. La région promotrice putative de mPGES-1 chez l'Homme est riche en GC, ne contient pas de TATA box ; elle présente deux GC-boxes ainsi que deux Barbie boxes en tandem et un site AHR (aryl hydrocarbon response element) <sup>88</sup>. L'étude de cette région promotrice grâce à un gène rapporteur dans des cellules A549 (cellules alvéolaires) a montré que Sp1 et Sp3 étaient responsables de la transcription basale du gène et que les deux boîtes GC étaient importantes pour cette transcription basale <sup>89</sup>. En revanche, l'inhibition de la transcription induite par le phénobarbital est indépendante de la présence des deux Barbie boxes sur la région promotrice. Le gène codant pour mPGES-1 est le seul gène connu comme étant régulé négativement par le phénobarbital, mais le mécanisme lié à cette activité inhibitrice est pour l'instant inconnu, probablement dépendant de l'intervention de facteurs trans-régulateurs produits par d'autres gènes <sup>89</sup>. Une autre étude, sur le promoteur de l'analogue murin de mPGES-1 cette fois <sup>90</sup>, a mis en évidence des sites de liaison pour C/EBP $\alpha$  et  $\beta$ , AP-1, deux boîtes GC en tandem, ainsi que deux progesterone receptor- et trois glucocorticoid receptor-responsive elements. Dans cette étude, il apparaît également que les deux boîtes GC jouent le rôle majeur dans la régulation de la transcription du gène par l'intermédiaire de la fixation du facteur Egr-1 (Early Growth Response-1), et non de Sp1 ou Sp3. L'expression de Egr-1 étant induite par l'activation des voies NF-kB <sup>73</sup> et

p38MAPK<sup>90</sup>, la transcription de mPGES-1 pourrait être secondairement régulée par des voies communes à celle de COX-2.

mPGES-1 est d'autre part la protéine codée par le gène appelé pig12 dans l'étude de Polyak et al. en 1997. Ce gène a été identifié comme étant l'un des 13 gènes activés par l'expression exogène, dans une lignée de cellules cancéreuses p53-mutées (DLD-1), du facteur de transcription p53. Dans cette étude, les auteurs font le lien entre l'expression de p53, l'induction des PIG, et l'apparition de ROS intracellulaires, responsables du déclenchement de l'apoptose dans les cellules. Ils semblent observer une convergence, parmi les différents PIG mis en évidence, vers la production de ROS, responsables de dommages mitochondriaux induisant l'apoptose p53-induite.

Malgré les éléments apportés par ces différentes études, le contrôle de l'expression de mPGES-1 est encore incomplet. La connaissance des éléments régulateurs de la région promotrice putative ne permettent pas d'expliquer tous les phénomènes d'induction observés. On peut cependant noter que divers facteurs pro-inflammatoires sont capables d'induire l'expression de mPGES-1 (LPS, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  par l'activation des voies ERK et p38MAPK), parfois de façon concomitante à celle de COX-2<sup>87,91</sup>. A l'inverse, l'expression de mPGES-1 est réprimée par des substances anti-inflammatoires (dexaméthasone<sup>87,91</sup>, PPAR $\gamma$ <sup>73</sup>).

mPGES-1 est une protéine inductible dans la plupart des tissus mais on la détecte de façon constitutive dans la prostate, le placenta, la glande mammaire et la vessie. Une forte expression de mPGES-1 a en outre été démontrée dans plusieurs lignées cancéreuses (HeLa et A549<sup>85</sup>).

L'activité enzymatique de mPGES-1 est dépendante du glutathion, en présence duquel cette activité est élevée (0,25 $\mu$ mol PGE<sub>2</sub>/mn/mg). Deux acides aminés sont fortement conservés dans la famille des MAPEG : Arg110 et Tyr117. Seule la mutation de Arg110 prive mPGES-1 de son activité catalytique, ce qui indique le caractère primordial de cet acide aminé pour la fonction catalytique de l'enzyme<sup>92</sup>. La cristallisation de mPGES-1 a révélé une structure trimérique de l'enzyme<sup>93</sup>.

Il a souvent été observé un couplage préférentiel de mPGES-1 avec COX-2<sup>85,87</sup>, bien que ce couplage ne soit pas exclusif<sup>94</sup>, ce qui corrèle avec le fait que la régulation de l'expression de ces deux enzymes soit similaire. Des travaux récents ont également suggéré une colocalisation de ces deux enzymes induite par le traitement de trophoblastes humains par l'IL-1 $\beta$ <sup>95</sup>. De façon assez inattendue, il a été en outre démontré que l'activité enzymatique de mPGES-1 était inhibée par certains AINS, notamment certains inhibiteurs dits spécifiques de

COX-2 (en particulier NS-398 et le sulindac sulfide, à l'inverse du fenoprofène par exemple)<sup>91</sup>. Cette donnée invite à interpréter sous une lumière nouvelle certains effets mal compris des inhibiteurs de COX-2.

Le rôle physiopathologique de mPGES-1 a été exploré par l'étude du phénotype de souris invalidées pour le gène mPGES-1<sup>94</sup>. Le phénotype de ces souris mPGES-1<sup>-/-</sup> est discret, elles sont viables, fertiles (en dépit d'une conduite d'élevage plus délicate, Jakobsson communication personnelle), et se développent de façon comparable aux souris mPGES-1<sup>+/+</sup> : apparence, comportement, masse corporelle, histologie (sur 39 tissus), paramètres hématologiques. Les macrophages issus des souris mPGES-1<sup>-/-</sup> ont une capacité de sécrétion de PGE<sub>2</sub> amoindrie. Cette observation ne modifie pas la sensibilité des animaux à la douleur. A l'inverse, la réponse inflammatoire des souris déficientes, en réponse à une polyarthrite induite de type immunitaire (CIA), est diminuée par rapport aux souris contrôle (oedème, lésions articulaires, signes cliniques). D'autre part, la réponse fébrile des souris déficientes à une injection intrapéritonéale de LPS est également diminuée<sup>96</sup>. Le rôle de mPGES-1 semble donc lié à la synthèse de PGE<sub>2</sub> en réponse à un stimulus inflammatoire.

### **I.3.2 cPGES**

L'enzyme cPGES a été identifiée en 2000 par Tanoika et al.<sup>97</sup>. C'est une protéine cytosolique, de 26kDa, identique à la protéine p23 précédemment identifiée comme co-chaperonne de la protéine Hsp90. Comme mPGES-1, cPGES appartient à la famille des GST et son activité enzymatique est dépendante de la présence de glutathion.

L'expression de cPGES est constitutive et ubiquitaire. A l'inverse de mPGES-1, elle n'est pas modifiée par la plupart des stimuli pro-inflammatoires, à l'exception d'une augmentation de son expression observée dans le cerveau après traitement par le LPS<sup>97</sup>. En revanche, l'activité de cPGES est régulée par phosphorylation<sup>73</sup>. Il est en effet rapporté que l'interaction de cPGES avec la protéine de stress Hsp90 favorise la phosphorylation de cPGES par la caséine kinase II en induisant un changement de conformation discret de cPGES. Cette phosphorylation accroît l'activité de l'enzyme et la production de PGE<sub>2</sub>. La dexaméthasone, ainsi que l'inhibition de la kinase p38 inhibent indirectement cPGES en inhibant sa phosphorylation par la caséine kinase II.

L'activité enzymatique de cPGES semble préférentiellement couplée à COX-1, comme le montrent des expériences de co-transfection <sup>97</sup> et comme le laisserait supposer son expression constitutive. Au vu de ces données concernant l'expression et le couplage de COX-1 et de cPGES, il est tentant de penser que ce couple enzymatique pourrait être responsable du maintien d'un niveau PGE<sub>2</sub> basal, physiologique. Cependant, cette hypothèse mérite d'être nuancée, ce couplage n'étant probablement pas exclusif.

### I.3.3 mPGES-2

En 1997, Watanabe et al. <sup>98</sup> montrent l'existence d'une PGE<sub>2</sub> synthase microsomale indépendante de la GSH, à l'inverse de celle mise en évidence dans les vésicules séminales de mouton <sup>99</sup>. Cette enzyme est purifiée en 2002 <sup>100</sup> et dénommée mPGES-2, par opposition à l'enzyme mPGES-1, GSH-dépendante, mise en évidence par l'équipe de Jakobsson.

Contrairement aux autres PGE<sub>2</sub> synthases, mPGES-2 n'appartient pas à la famille des GST (glutathion S-transférases). Elle est codée par un gène porté par le chromosome 9, sur un locus très proche (9q33-q34) de ceux de COX-2, mPGES-1 et L-PGDS (lipocalin-like PGD<sub>2</sub> synthase) <sup>100</sup>.

mPGES-2 a tout d'abord été mise en évidence dans le cœur de boeuf sous la forme d'une protéine de 33kDa. Il s'est en fait avéré que cette protéine était, pour une raison inconnue, délétée de sa partie N-terminale. La protéine entière, identifiée notamment chez l'Homme, est une protéine de 42kDa <sup>100</sup>. Ses 87 premiers acides aminés sont responsables de son insertion dans les membranes microsomales. La délétion de ceux-ci n'altère pas l'activité enzymatique de mPGES-2, qui n'est alors plus insérée dans les membranes mais simplement associée à celles-ci. Le caractère factuel ou artefactuel de la troncature de la séquence d'insertion est encore incertain, bien que d'autres équipes aient également mis en évidence la forme à 32kDa de l'enzyme chez l'Homme, seule <sup>101</sup> ou conjointement à la forme longue, la troncature apparaissant alors comme un mécanisme de translocation de l'enzyme <sup>92</sup>.

Chez l'Homme, mPGES-2 est détectée de façon constitutive dans le cœur, le cerveau, le rein, la rate mais pas dans les organes du tractus génital, à l'inverse de mPGES-1.

Le site catalytique de mPGES-2 présente une séquence Cys110-x-x-Cys113, consensus des sites actifs des thioredoxines et glutaredoxines <sup>73</sup>. La mutation de Cys110, mais pas celle de Cys113, abroge l'activité de l'enzyme. La cristallisation de l'enzyme, sous forme

de complexe avec l'indométhacine <sup>102</sup>, indique qu'elle fonctionnerait sous forme de dimère, voire de tétramère. Dans ce cristal, les résidus Cys110 et Cys113 participeraient à la formation d'une chaîne de liaisons hydrogène, impliquant également les résidus Tyr107 et Phé112. L'activité enzymatique de mPGES-2 est stimulée en présence d'un donneur de -SH ( $\beta$ -mercaptoéthanol, GSH ou surtout DTT) <sup>100</sup>.

mPGES-2 est capable de coupler son activité aussi bien à celle de COX-1 qu'à celle de COX-2 <sup>92</sup>, ce couplage dépendant de la concentration en acide arachidonique (cf paragraphe sur la dépendance de COX-1 et COX-2 au niveau d'acide arachidonique).

L'activité enzymatique de mPGES-2 est inhibée par l'indométhacine, inhibiteur de COX, ce qui remet encore une fois en cause la spécificité des AINS <sup>102</sup>.

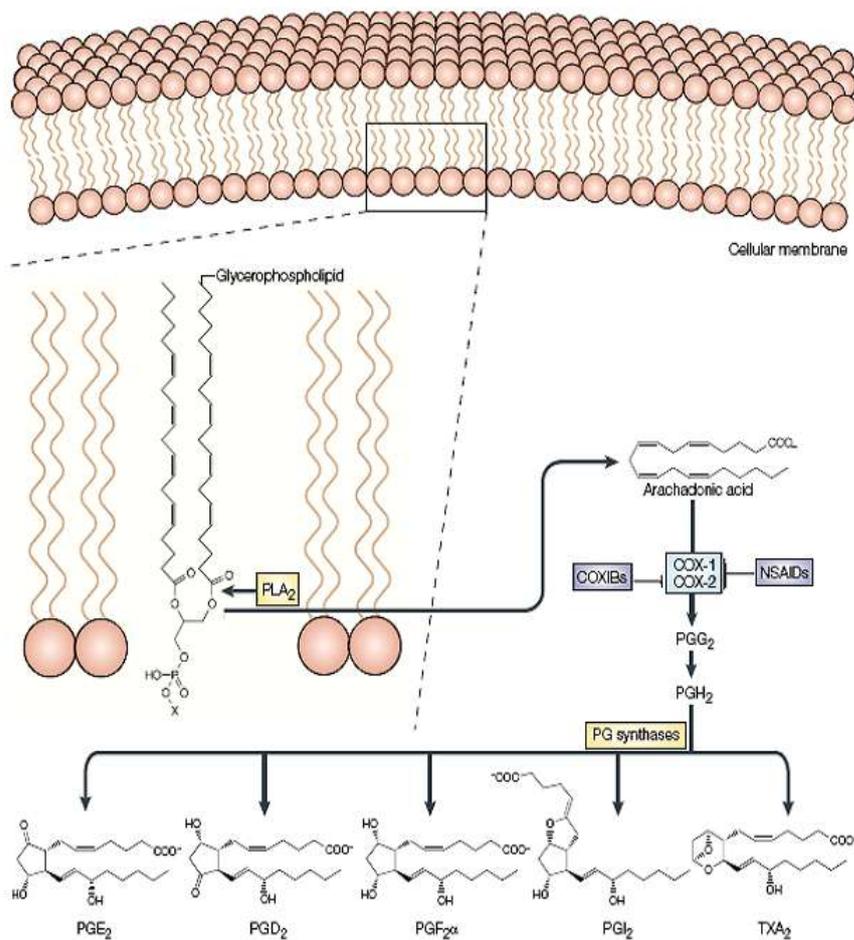


Figure 12 : voie de synthèse des prostanoïdes <sup>103</sup>.

## ***II Dégradation de PGE<sub>2</sub>***

Dans la cellule, PGE<sub>2</sub> est rapidement dégradée en métabolites éliminés par voies urinaire et fécale. Le catabolisme de PGE<sub>2</sub> fait intervenir 2 enzymes en série. La première est la 15-hydroxyprostaglandine déshydrogénase (15-PGDH). Elle catalyse l'oxydation de PGE<sub>2</sub> en 15-kétoPGE<sub>2</sub>. Cette réaction est réversible et dépendante du cofacteur NAD<sup>+</sup>. En conditions basiques (pH 9), l'oxydation est favorisée, alors que l'équilibre se déplace vers la réduction en conditions acides (pH 5,5). Un autre type de 15-PGDH (type II, ou carbonyl-réductase) utilise NAD<sup>+</sup> ou NADP<sup>+</sup> comme cofacteurs et est moins spécifique du substrat qu'elle oxyde (prostaglandines, leukotriènes). Son affinité moindre pour les prostaglandines laisse supposer un rôle secondaire dans le catabolisme de PGE<sub>2</sub> par rapport à la 15-PGDH de type I<sup>104</sup>. Greenland et al.<sup>105</sup> ont montré que l'expression de la 15-PGDH était contrôlée par un mécanisme complexe et spécifique du type cellulaire étudié. Notamment, l'expression de la 15-PGDH est stimulée par AP-1 ainsi que par les facteurs de transcription de la famille des Ets, en particulier PEA-3. Il est à noter que l'activation induite par PEA-3 est inhibée par des inhibiteurs de CREB ou d'AP-1, suggérant que ces facteurs de transcription jouent un rôle dans l'activation du promoteur de la 15-PGDH par PEA-3<sup>105</sup>.

La 15-PGDH est exprimée de façon ubiquitaire dans l'organisme, à l'exception du cerveau où son niveau d'expression chute radicalement à la naissance<sup>106</sup>. Ceci implique que les prostaglandines (PGE<sub>2</sub> en particulier) doivent rejoindre la circulation sanguine au niveau du plexus choroïde pour être dégradées dans les cellules exprimant PGDH. Deux organes sont essentiels dans la clairance de PGE<sub>2</sub>, le foie et le poumon.

Le rôle de la 15-PGDH dans la cancérogenèse a été étudié dans différents types de cancers. Dans le cancer du poumon, Ding et al.<sup>107</sup> ont montré que la surexpression de la 15-PGDH diminuait le potentiel tumorigénique des cellules A549, augmentait l'apoptose dans ces cellules et diminuait leur potentiel invasif (inhibition de CD44), faisant de la 15-PGDH un anti-oncogène. A l'inverse, dans le cancer de la prostate, une induction de la 15-PGDH par les androgènes a été observée dans une lignée cancéreuse hormono-dépendante (LNCaP), selon une voie non conventionnelle, alors que le traitement s'est avéré inefficace dans une lignée non hormono-dépendante (PC3)<sup>108</sup>. Une autre étude sur le cancer de la prostate<sup>109</sup> a montré par microarray que les gènes codant pour COX-2 et 15-PGDH étaient réprimés et surexprimés respectivement par le métabolite actif de la vitamine D (calcitriol), dont l'activité anti-cancéreuse, démontrée *in vitro*, est en cours d'évaluation clinique. Des données plus

nombreuses existent dans le cancer du côlon. Toujours par microarray, Yan et al. <sup>110</sup> ont observé une forte répression du gène codant pour la 15-PGDH dans le tissu colique tumoral, ainsi qu'une forte induction de l'enzyme après traitement de cellules coliques par le suppresseur de tumeurs TGF- $\beta$ . Les travaux supervisés par DuBois ont quant à eux montré la perte d'expression protéique et d'activité PGDH dans plusieurs lignées de carcinome colorectal humain <sup>111</sup>, en impliquant la voie de signalisation EGF/Snail comme base de cette répression <sup>112</sup>.

Cependant, 2 études de Celis et al. ont suggéré que la perte de l'expression de PGDH était un phénomène tardif dans la carcinogenèse vésicale <sup>113</sup> et mammaire <sup>114</sup>.

De façon surprenante, il a été montré que de nombreux AINS et agonistes de PPAR $\gamma$  avaient pour effet secondaire d'inhiber l'activité de la 15-PGDH de type I <sup>115</sup>.

La seconde étape de dégradation de PGE<sub>2</sub> implique la  $\Delta$ 13-15-kétoprostaglandine réductase (13-PGR) <sup>104</sup>. Cette enzyme catalyse la réduction de la double liaison  $\Delta$ 13 des 15-kétoprostaglandines de façon NADPH/NADH-dépendante. Elle est exprimée dans de nombreux tissus chez les Mammifères. Ses substrats majoritaires sont 15-kéto-PGE<sub>1</sub>, 15-kéto-PGE<sub>2</sub>, 15-kéto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  et 15-kéto-PGF<sub>2 $\alpha$</sub> . Elle possède également une activité 9-kétoréductase et peut donc catalyser la conversion de PGE<sub>2</sub> en PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  <sup>116</sup>. Le rôle biologique de la 13-PGR pourrait être d'inactiver les 15-kétoprostaglandines, responsables de l'inflammation liée au développement tumoral. Peu de données sur son rôle dans la cancérogenèse sont cependant disponibles.

### ***III Sécrétion de PGE<sub>2</sub>***

La diffusion de PGE<sub>2</sub> à travers la membrane est d'une efficacité moyenne. Ce phénomène implique des protéines de transport transmembranaires.

Ivanov et al. <sup>116</sup> ont montré une co-régulation des 2 enzymes de dégradation de PGE<sub>2</sub> et de 2 transporteurs capables de faire entrer PGE<sub>2</sub> dans les cellules (PGT et MOAT) au cours des 3 phases de la fièvre au niveau pulmonaire et hépatique. Cette régulation indique donc un rôle du transport transmembranaire des prostaglandines dans la régulation de la concentration sanguine de PGE<sub>2</sub>.

### III.1 Diffusion passive

Il a longtemps été admis que les prostaglandines diffusaient librement au travers des membranes biologiques. La réalité de ce mécanisme de diffusion a été vérifié sur des oeufs de *Xenopus*<sup>117</sup>. En dépit d'une efficacité de diffusion faible ( $10^{-6}$ cm/s), il est supposé que les prostaglandines diffusent au travers de la membrane plasmique en raison de leur charge ionique. Elles existeraient sous la forme d'anions univalents ( $-\text{COO}^-$ ), ce qui favoriserait leur diffusion vers l'espace extra-cytoplasmique. D'autre part, la diffusion de  $\text{PGE}_2$  au travers de monocouches cellulaires semble se faire au niveau des "tight-junctions", comme l'attestent la faible vitesse et l'efficacité médiocre. D'autres mécanismes sont donc impliqués dans le passage de  $\text{PGE}_2$  au travers des membranes.

### III.2 PGT

La PGT (prostaglandin transporter) est une protéine exprimée à la surface de la plupart des cellules, en particulier tumorales dans le cas des cancers prostatique et colo-rectal<sup>117</sup>. C'est une pompe échangeuse d'anions, qui est présumée fonctionner en échangeant une molécule de  $\text{PGE}_2$  sous sa forme anionique contre une molécule de lactate<sup>118</sup>, bien que des travaux de transfection sur des oeufs de *Xénope* aient suggéré qu'elle puisse fonctionner indépendamment du lactate en présence d'ATP<sup>119</sup>. Il a été montré que cette pompe pouvait fonctionner dans les deux sens<sup>118</sup>, en transportant les prostaglandines vers le milieu extracellulaire ou vers le cytoplasme en fonction des gradients respectifs en lactate et en prostaglandines. Dans la plupart des cellules, le gradient de lactate est dirigé vers l'extérieur de la cellule, PGT fonctionne alors en transportant  $\text{PGE}_2$  vers le cytoplasme. Cependant, l'environnement des cellules cancéreuses est souvent riche en lactate, ce qui pourrait conduire à une inversion du fonctionnement de la pompe. Elle est capable de transporter avec des efficacités comparables  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGD}_2$  et  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , mais pas leurs métabolites oxydés (15-kétoprostaglandines), impliquant que ceux-ci diffusent de façon passive ou par une autre voie.

### III.3 MOAT

Il existe de nombreuses protéines de la famille des OATP (organic anion transporter polypeptides) autres que PGT. Parmi elles, MOAT (multispecific organic anion transporter) est également un transporteur de prostaglandines répertorié <sup>116,117</sup>. MOAT est exprimée de façon ubiquitaire chez l'Homme, peut-être même plus que PGT. Chez le rat, elle présente une affinité similaire pour PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub> et PGD<sub>2</sub> ; en revanche, l'utilisation de PGE<sub>2</sub> comme substrat de la forme humaine de MOAT semble discutée <sup>117</sup>. Elle fonctionne comme un échangeur d'anions, échangeant les prostaglandines contre l' $\alpha$ -kéto-glutarate, lequel peut être accumulé dans la cellule par un cotransport avec Na<sup>2+</sup>.

Il a été montré que l'indométhacine, utilisée pour ses propriétés inhibitrices des cyclo-oxygénases, inhibait le fonctionnement de MOAT <sup>117</sup>.

### III.4 MRP

Les MRP (multidrug-resistance proteins) sont une autre famille de protéines identifiées comme des transporteurs d'eicosanoïdes <sup>117</sup>. Parmi ces protéines, MRP4 est particulièrement intéressante pour le contrôle de la sécrétion de PGE<sub>2</sub>. En effet, Reid et al. <sup>120</sup> ont établi qu'elle avait dans les cellules en culture une activité de transporteur de PGE<sub>2</sub> vers le compartiment extra-cytoplasmique. Alors qu'aucune des autres MRP testées (1-5) ne remplit cette fonction, MRP4 semble relativement spécifique de PGE<sub>1</sub> et PGE<sub>2</sub>, bien que PGA<sub>1</sub>, PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  et PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  apparaissent comme des inhibiteurs de ce transport donc des substrats potentiels. Le transport effectué par MRP4 est ATP-dépendant et inhibé par la plupart des AINS, les plus efficaces étant l'indométhacine et les dérivés propioniques de l'acide carboxylique (kétoprofène, ibuprofène, flurbiprofène). Ceci remet à nouveau en cause la technique consistant à mesurer l'efficacité des inhibiteurs de COX en mesurant le relargage de PGE<sub>2</sub> <sup>120</sup>. Dans le cerveau, l'expression de MRP4 est cantonnée aux astrocytes et aux cellules microgliales <sup>121</sup>.

## Voies de signalisation connues de PGE<sub>2</sub>

### *I Présentation des récepteurs membranaires aux prostanoïdes*

#### **I.1 Généralités**

L'acide arachidonique est à l'origine, à travers l'activité des cyclo-oxygénases, de 5 prostanoïdes primaires : PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGI<sub>2</sub> et TXA<sub>2</sub>. Il existe pour chacune de ces molécules des récepteurs membranaires spécifiques nommés respectivement DP, EP(1-4), FP, IP et TP. Les récepteurs EP sont les seuls à exister sous 4 formes, codées par des gènes distincts <sup>122</sup> ; en outre, certains existent sous différents variants d'épissage : TP, FP, EP1 et EP3 (8 variants chez l'Homme).

Ces récepteurs des prostanoïdes font partie d'une famille de récepteurs de type rhodopsine, couplés par leur extrémité intracellulaire à de petites protéines G (G pour guanine nucleotide-binding protein) <sup>123</sup>. Sur le plan de leur structure, ces récepteurs sont composés de 7 segments transmembranaires. Ils possèdent peu d'homologie de séquence (20-30%) <sup>122</sup>, mais présentent des structures voisines. D'ailleurs, bien que chacun des récepteurs présente une affinité particulièrement forte pour le ligand qui lui est relatif, des fixations croisées des différentes prostaglandines sur les récepteurs de la famille sont possibles <sup>122</sup>.

L'extrémité C-terminale intracellulaire des récepteurs présente une forte variabilité, d'un récepteur à l'autre, mais aussi d'un isotype à l'autre. Cette variabilité C-terminale est responsable des rôles divers, parfois opposés, des différents récepteurs et/ou isotypes. En effet, la partie C-terminale de la protéine présente des sites d'interaction avec différentes protéines G, parfois des sites de phosphorylation, déterminant la voie de signalisation activée par la fixation du ligand <sup>122</sup>.

Trois types de protéines G sont majoritairement couplées aux récepteurs membranaires des prostanoïdes : les protéines G<sub>s</sub>, G<sub>i</sub> et G<sub>q</sub>. Le couplage peut se faire de façon moins fréquente avec d'autres protéines G : TP peut ainsi être couplé à G<sub>q</sub> et G<sub>i2</sub>, G<sub>q</sub> et une autre protéine indéterminée, G<sub>i1</sub>, G<sub>i2</sub> et G<sub>i3</sub>, EP1 pourrait être couplé à une protéine encore non déterminée, différente de G<sub>q</sub>, et EP3 activer une voie passant par la petite protéine G Rho, suite à son interaction avec G<sub>i2</sub> ou G<sub>i3</sub> <sup>122,123</sup>.

## **I.2 Voies de signalisation en aval de la protéine G<sub>s</sub>**

On trouve dans la catégorie des récepteurs couplés à la protéine G<sub>s</sub> les récepteurs DP, EP2 et EP4, IP, et certaines isoformes des récepteurs EP3 et TP <sup>123</sup>.

La fixation du ligand sur ces récepteurs induit l'activation de la protéine G<sub>s</sub>, activant à son tour l'adénylate cyclase. L'activation de cette enzyme induit la production d'un second messenger, l'AMP cyclique (AMPC). Celui-ci est responsable de l'activation de la protéine kinase AMPC-dépendante (ou PKA), entraînant la phosphorylation du facteur de transcription CREB <sup>124</sup>. Cette fixation du ligand sur son récepteur aboutit donc à la transcription de gènes dont le promoteur présente des boîtes CRE (cAMP responsive element), parmi lesquels COX-2, Bcl-2, EP3 (ainsi que SOD2, VEGF, PGC-1 (PPAR $\gamma$  coactivator-1), caspase-7 entre autres) <sup>125</sup>.

D'autre part, la production d'AMPC est également responsable de l'inhibition du facteur Raf, induisant à la fois l'inhibition des MAP kinases (Raf appartenant aux kinases de la famille des MAP kinases) et l'inhibition de l'expression des facteurs de transcription c-Jun et JunB <sup>124</sup>.

## **I.3 Voies de signalisation en aval de la protéine G<sub>i</sub>**

Les récepteurs couplés à la protéine G<sub>i</sub> sont des isoformes des récepteurs EP3 et TP <sup>123</sup>.

L'activation de la protéine G<sub>i</sub> induite par la liaison ligand-récepteur est responsable de l'inhibition de l'adénylate cyclase, inhibant la production d'AMPC cellulaire. Les voies de signalisation mises en oeuvre par ces récepteurs sont donc antagonistes des précédentes.

## **I.4 Voies de signalisation en aval de la protéine G<sub>q</sub>**

La protéine G<sub>q</sub> est couplée aux récepteurs FP, IP, EP1, ainsi qu'à certaines isoformes des récepteurs EP3 et TP <sup>123</sup>.

L'activation de la protéine G<sub>q</sub> par la fixation du ligand sur son récepteur induit l'activation de la phospholipase C (PLC) <sup>124</sup>. Cette enzyme hydrolyse le PIP<sub>2</sub> (phosphatidyl-inositol diphosphate) en inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) et en diacyl-glycérol (DAG). L'IP<sub>3</sub> produit active les récepteurs IP<sub>3</sub>-R présents sur le réticulum, induisant un relargage cytoplasmique de Ca<sup>2+</sup>. Le Ca<sup>2+</sup> libéré, ainsi que le DAG produit par la PLC, activent à leur tour la protéine kinase C (PKC), capable alors d'activer la voie des MAP kinases par l'intermédiaire des kinases Raf et MEK <sup>124</sup>. Il est à noter que la libération du Ca<sup>2+</sup> ainsi que l'activation des MAP kinases sont capables d'activer la cPLA<sub>2</sub>, l'activation des MAP kinases pouvant aussi être à l'origine d'une induction de la transcription de COX-2 et de mPGES-1 (cf synthèse des PG), donc potentiellement la synthèse de nouvelles prostaglandines.

La diversité des voies de signalisation activables par PGE<sub>2</sub> par l'intermédiaire de ses différents récepteurs membranaires, aux effets parfois opposés, rend bien compte de la diversité d'effets biologiques que peut exercer PGE<sub>2</sub>. Ces effets dépendent non seulement du (des) type(s) de récepteurs exprimé(s) par la cellule, mais aussi du variant (cf EP3 et ses variants d'épissage aux rôles multiples) et de la nature du couplage en aval. Ceci traduit la complexité de la tâche qui consiste à prévoir le rôle de PGE<sub>2</sub> dans un organe ou une situation physiopathologique donnée.

## ***II PGE<sub>2</sub> et pathologie***

PGE<sub>2</sub> est impliqué dans la régulation de nombreux processus physio-pathologiques. L'utilisation de souris délétées pour chacun des 4 récepteurs a permis d'évaluer la contribution de chacun dans ces différents processus <sup>126</sup>. Seuls seront détaillés ici les processus pathologiques directement liés à l'apoptose, les maladies neuro-dégénératives et le cancer, avec pour préambule le rôle de PGE<sub>2</sub> dans l'inflammation, qui co-existe généralement avec les deux pathologies précitées.

## II.1 PGE<sub>2</sub> et inflammation

PGE<sub>2</sub> a de longue date été désigné comme un médiateur majeur de l'inflammation, de la douleur et de la fièvre, bien que le raccourci ait souvent été fait entre surexpression de COX-2 et augmentation de la sécrétion de PGE<sub>2</sub>. Son rôle a depuis été nuancé avec la découverte d'autres médiateurs d'importance (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , NGF) <sup>127</sup>.

L'activation des p38MAP kinases est un élément-clé de l'activation des cellules microgliales <sup>127</sup>, voie activable par la fixation de PGE<sub>2</sub> sur ses récepteurs EP1 et EP3.

PGE<sub>2</sub> module également la réponse immunitaire en l'orientant vers une réponse de type 2 <sup>128</sup>. D'une part, PGE<sub>2</sub> induit l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T et à la sélection des lymphocytes T immatures. Il favorise également la réponse Th2 en inhibant la sécrétion des cytokines Th1 (IFN- $\gamma$ , IL-2). L'action de PGE<sub>2</sub> sur les cellules B consiste en une stimulation de l'expression du CMH de classe II par les cellules ainsi qu'une stimulation de la sécrétion d'IgG1 et d'IgE. Enfin, l'action de PGE<sub>2</sub> sur les cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques et macrophages) favorise également la réponse Th2 ; elle oriente les cellules dendritiques vers la sécrétion des cytokines favorisant la réponse Th2 (IL-10) aux dépens de l'IL-12 et inhibe la sécrétion de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 et IL-12 par les macrophages. Il est à noter chez ces cellules immunitaires une expression des récepteurs EP2 et EP4 lors de l'inflammation, suggérant leur implication dans les modifications observées.

Une double étude de Ivanov et al. <sup>116,129</sup> a montré l'évolution de la régulation transcriptionnelle de différentes protéines, impliquées dans le contrôle du taux de PGE<sub>2</sub> systémique, au cours des trois phases de l'inflammation induite par le LPS. Ils ont ainsi établi que dans le poumon et dans le foie, deux organes majeurs dans le catabolisme de PGE<sub>2</sub>, l'expression des enzymes responsables de la synthèse de PGE<sub>2</sub> était up-régulée au cours des 3 phases de l'inflammation (à des degrés divers). En contrepartie, les enzymes de dégradation (15-PGDH et carbonyl-réductase) et les protéines responsables de l'internalisation cellulaire de PGE<sub>2</sub> (PGT et MOAT) sont down-régulées au cours de la phase de résolution de l'inflammation. Dans l'hypothalamus, la transcription des enzymes de synthèse augmente de façon similaire, alors qu'aucune modification n'est observée pour les acteurs du catabolisme. L'absence de modification transcriptionnelle du système de dégradation de PGE<sub>2</sub> dans l'hypothalamus au cours de l'inflammation corrobore les observations de Krunik et al. <sup>106</sup>

indiquant l'absence d'activité 15-PGDH dans le cerveau adulte et la nécessité du transport de PGE<sub>2</sub> à travers la barrière hémato-encéphalique en vue de sa dégradation dans les organes spécialisés. Ces données suggèrent également un rôle de PGE<sub>2</sub> dans la phase de résolution de l'inflammation, le flux de PGE<sub>2</sub> lors de cette phase se faisant dans le sens sang-cerveau. La signification biologique de cette observation n'est cependant pas encore déterminée.

## **II.2 PGE<sub>2</sub> et maladies neuro-dégénératives**

Des processus inflammatoires sont largement mis en cause dans la survenue des lésions nerveuses caractéristiques de la plupart des maladies neuro-dégénératives (maladie d'Alzheimer, syndrome de Parkinson, sclérose latérale amyotrophique)<sup>130-132</sup>.

Une surexpression neuronale de COX-2 a parfois été associée à ces processus neuro-dégénératifs<sup>133,134</sup>, en dépit de l'expression basale constitutive de COX-2 dans le système nerveux central. Dans des modèles animaux, la surexpression sélective de COX-2 dans les neurones est associée à des déficits de mémorisation, des troubles comportementaux et une apoptose neuronale importante<sup>131</sup>.

Plusieurs études ont montré que la fixation de PGE<sub>2</sub> sur les récepteurs EP neuronaux médiaient, au moins en partie, les effets de la surexpression de COX-2. Il apparaît ainsi que les récepteurs EP1 sont les médiateurs de la neurotoxicité de PGE<sub>2</sub><sup>70</sup>; à l'inverse, l'activation des récepteurs EP2 et EP4 induit une neuroprotection<sup>135,136</sup>.

PGE<sub>2</sub> joue donc un double rôle dans l'évolution des maladies neurodégénératives : d'une part, il stimule le système immunitaire, provoquant une inflammation cérébrale chronique, et il régule d'autre part la sensibilité des neurones.

## **II.3 PGE<sub>2</sub> et cancer**

L'efficacité des AINS, en particulier des inhibiteurs de COX-2, comme traitement adjuvant ou préventif d'un certain nombre de cancers est avérée<sup>103</sup>. Il a été montré que, dans la plupart des cas, la diminution de la production de PGE<sub>2</sub> induite par cette inhibition était

impliquée dans ces effets. Bien que le raccourci entre COX-2 et PGE<sub>2</sub> soit contestable, ainsi qu'il sera discuté ultérieurement, il est justifié dans bon nombre de situations.

Deux paramètres sont généralement observés pour impliquer PGE<sub>2</sub> dans la carcinogénèse, l'expression des enzymes de synthèse et la sensibilité des cellules cancéreuses aux AINS. L'utilisation d'AINS à long terme est un facteur diminuant l'incidence des nombreux cancers, notamment le cancer colo-rectal, le cancer du sein, de l'oesophage, du poumon, de la vessie<sup>137</sup>. Les AINS, en dépit de certains effets indépendants de PGE<sub>2</sub><sup>138</sup>, régulent la production et la sécrétion de PGE<sub>2</sub>. PGE<sub>2</sub> peut alors avoir un impact local sur les cellules environnantes et participer à la régulation de la croissance tumorale.

La surexpression des enzymes de synthèse de PGE<sub>2</sub> (COX-2 et PGES) est rapportée dans de nombreux types de tumeurs solides<sup>139</sup> et même parfois dans des lésions pré-cancéreuses. A l'inverse, une inhibition de la 15-PGDH, catabolisant PGE<sub>2</sub>, a été observée dans le cancer colorectal<sup>111,112</sup>, le cancer du poumon<sup>107</sup> et de la vessie<sup>140</sup>. Cependant, plusieurs études révèlent que la surexpression de COX-2 est indépendante de celle de mPGES (<sup>141</sup> et observations personnelles). Ainsi, COX-2 est surexprimée dans le cancer colo-rectal<sup>142</sup>. La surexpression de COX-2 est également un marqueur de mauvais pronostic dans le cancer du sein, souvent associée à celle de Her-2<sup>143</sup>. Dans le glioblastome, la situation est plus confuse : il semble que COX-2 soit généralement surexprimée dans les astrocytomes, d'autant plus dans les astrocytomes de haut grade, mais il existe une grande hétérogénéité entre les tumeurs<sup>139,144,145</sup>. mPGES quant à elle est surexprimée dans des adénomes et des tumeurs colo-rectales<sup>146</sup>, ainsi que dans le cancer du poumon<sup>141</sup>. Dans des lignées cellulaires, il a également été montré que la surexpression conjointe de COX-2 et de mPGES-1 pouvait participer à la transformation cancéreuse des cellules<sup>92</sup>.

Les récepteurs EP sont exprimés de façon globalement ubiquitaire. Cependant, peu de données existent sur l'expression protéique et la localisation tissulaire et cellulaire des différents récepteurs<sup>126</sup>. Il a été montré dans un modèle de carcinogénèse mammaire dans la souris une surexpression des récepteurs EP1, 2 et 4 dans les tumeurs et une diminution de l'expression d'EP3<sup>147</sup>. La surexpression des récepteurs EP4 a par ailleurs été observée dans le cancer colo-rectal et, dans une moindre mesure, dans des adénomes colo-rectaux<sup>148</sup>. Différentes études utilisant des agonistes ou antagonistes spécifiques des récepteurs EP, ou encore des souris délétées pour l'un des récepteurs, ont été conduites pour étudier l'évolution de différents types de tumeurs solides dépendante de PGE<sub>2</sub><sup>149</sup>. Le rôle promoteur de PGE<sub>2</sub> dans le cancer du colon a ainsi été imputé à sa fixation sur ses récepteurs EP1, 2 et 4, alors

que les récepteurs EP3 ne semblent pas impliqués. De la même façon, les récepteurs EP1 et EP3 semblent impliqués respectivement dans l'apparition de tumeurs mammaires chimio-induites et dans l'angiogenèse et la croissance tumorale de tumeurs pulmonaires. Il apparaît donc que le rôle des récepteurs EP soit différent selon la tumeur, voire selon l'individu. Le niveau d'expression relatif des récepteurs membranaires est probablement un facteur de variabilité important.

L'activation des récepteurs EP portés par les cellules cancéreuses ou par les cellules stromales tumorales conduit à l'activation de différentes voies de signalisation décrites précédemment. Certaines sont impliquées dans la croissance de la tumeur.

PGE<sub>2</sub> induit la prolifération des cellules cancéreuses par l'activation de la voie des MAP kinases. La phosphorylation du facteur de transcription CREB induit d'autre part l'expression de protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, ou le facteur de transcription NF-κB) et pro-angiogéniques (VEGF). L'augmentation du rapport Bcl2/Bax induite par PGE<sub>2</sub> a ainsi été montrée *in vitro* sur des cellules cancéreuses ovariennes<sup>150</sup>. La résistance à l'apoptose induite par PGE<sub>2</sub> est en outre médiée dans le cancer colo-rectal par l'activation de PPARδ<sup>151</sup>. Outre ces capacités accrues de prolifération et de survie, le potentiel invasif des cellules cancéreuses est un autre élément en partie régulé par PGE<sub>2</sub>. En effet, l'inhibition pharmacologique de COX-2 inhibe la migration de cellules HUVEC<sup>152</sup>. Enfin, en favorisant la réponse immunitaire de type Th2 aux dépens de la réponse Th1 (cf ci-dessus), PGE<sub>2</sub> facilite l'échappement des cellules tumorales au système immunitaire.

Il est à noter qu'une trans-activation directe du récepteur à l'EGF a été décrite suite à l'activation des récepteurs EP dans le cancer colo-rectal<sup>153</sup> et EP4 dans le cancer de l'oesophage<sup>154</sup>. Dans le cancer colo-rectal, cette trans-activation accroît la capacité de migration des cellules cancéreuses<sup>153</sup>.

PGE<sub>2</sub>, par l'intermédiaire de ses récepteurs membranaires, favorise donc de multiples conditions de la progression tumorale décrits par Hanahan<sup>2</sup> : prolifération accrue, résistance à l'apoptose, angiogenèse, échappement au système immunitaire, potentiel invasif augmenté (**figure 13**).

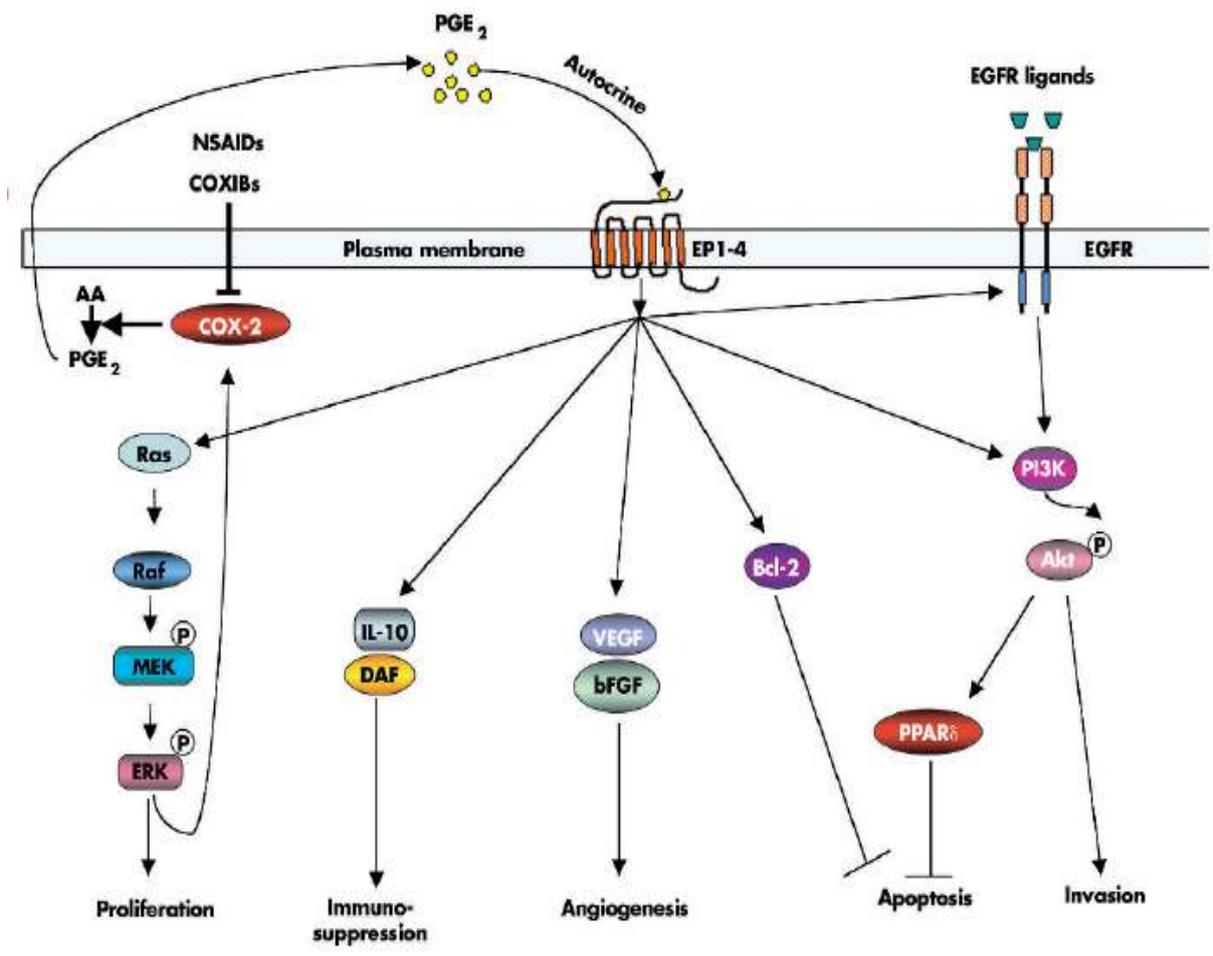


Figure 13 : voies de signalisation de PGE<sub>2</sub> par l'intermédiaire de ses récepteurs <sup>137</sup>.

## Résultats expérimentaux

### ***I Rôle de mPGES-1 dans le contrôle de l'apoptose dans le glioblastome***

[Oncogene](#). 2007 Jul 26;26(34):4999-5009. Epub 2007 Mar 19.

**Increase in PGE2 biosynthesis induces a Bax dependent apoptosis correlated to patients' survival in glioblastoma multiforme.**

[Lalier L](#), [Cartron PF](#), [Pedelaborde F](#), [Olivier C](#), [Loussouarn D](#), [Martin SA](#), [Meflah K](#), [Menanteau J](#), [Vallette FM](#).

INSERM U 601-Equipe 4, 9 Quai MONCOUSU, Cedex 01, Nantes, France.

Prostaglandin E(2) plays multiple roles both in the physiology and the physiopathology of human brain, which are not completely understood. We have identified in a subset of human glioblastoma multiforme (GBM) tumors, the most common form of adult brain cancer, an increased expression of mPGES-1, the enzyme which catalyses the isomerization of PGH(2) into PGE(2) downstream of cyclooxygenase 2 (COX-2). The sensitivity of primary cultures of GBM to apoptosis was augmented by the overexpression of mPGES-1, whereas the knockdown of its expression by shRNA decreased the apoptotic threshold in vitro and stimulated tumor growth in vivo. Adding extracellular PGE(2) in the culture medium failed to reproduce mPGES-1 effect on the cell viability in vitro. However, the intracellular injection of PGE(2) induced a dose-dependent apoptosis in GBM cultures, which was dependent on the presence of Bax, a pro-apoptotic protein. We show that PGE(2) physically associates with Bax, triggering its apoptotic-like change in conformation and its subsequent association with mitochondria. Our results raise questions about the role of PGE(2) in the control of apoptosis and in its potential impact in central nervous system pathologies.

# **Increase in PGE<sub>2</sub> biosynthesis induces a Bax dependent apoptosis correlated to patients' survival in *Glioblastoma multiforme*.**

Lisenn LALIER<sup>1,2</sup>, Pierre-François CARTRON<sup>1,2</sup>, François PEDELABORDE<sup>1,2</sup>, Christophe OLIVIER<sup>1,2</sup>, Delphine LOUSSOUARN<sup>3</sup>, Stéphane A MARTIN<sup>4</sup>, Khaled MEFLAH<sup>1,2</sup>, Jean MENANTEAU<sup>1,2</sup>, François M. VALLETTE<sup>1,2</sup> \*

1. INSERM U 601-Equipe 4, 9 Quai MONCOUSU 44035 Nantes. Cedex 01 France.
2. University of Nantes, Faculty of Medicine, 9 quai MONCOUSU 44035 Nantes. Cedex 01 France.
3. Department of Anatomic-Pathology, G & R Laennec Hospital, CHU Nantes. France
4. Department of Neurosurgery, G & R Laennec Hospital, CHU Nantes. France

\*Corresponding author: Dr FM VALLETTE, INSERM U601, 9 Quai MONCOUSU 44035 Nantes. Cedex 01 France. Tel: 33-240084081; Fax: 33-240084082

e-mail : [francois.vallette@univ-nantes.fr](mailto:francois.vallette@univ-nantes.fr)

Abbreviations: COX-2: cyclooxygenase 2; mPGES-1: microsomal prostaglandin E<sub>2</sub> synthase; GBM: Glioblastoma multiforme; BeGBM: Bax-expressing GBM; BdGBM: Bax-deficient GBM; PGE<sub>2</sub>: prostaglandin E<sub>2</sub>; PGD<sub>2</sub>: prostaglandin D<sub>2</sub>; IVT: in vitro translated; AChE: acetylcholine esterase.

Key words: gliomas, cyclooxygenase, prostaglandin synthase, apoptosis, bax, PGE<sub>2</sub>.

Acknowledgements: This work was supported by a special grant from the Ligue contre le Cancer (Equipe labellisée Ligue). We thank Pr PJ Jakobsson (Karolinska institutet, Sweden) for the gift of mPGES-1 cDNA and antibody, Dr J. Grassi (CEA/Saclay, France) for the gift of AChE-coupled PGE<sub>2</sub> and recombinant AChE, Drs P. Juin and L. Oliver (INSERM U601) for fruitful advices and comments. We thank also Pr JF Mosnier (Department of Anatomic-Pathology, CHU G & R Laennec, Nantes) for his support throughout this study.

Prostaglandin E<sub>2</sub> plays multiple roles both in the physiology and the physiopathology of human brain which are not completely understood. We have identified in a subset of human *glioblastoma multiforme* (GBM) tumors, the most common form of adult brain cancer, an increased expression of mPGES-1, the enzyme which catalyzes the isomerization of PGH<sub>2</sub> into PGE<sub>2</sub> downstream of cyclooxygenase 2 (COX-2). The sensitivity of primary cultures of GBM to apoptosis was augmented by the overexpression of mPGES-1 while the knock-down of its expression by shRNA decreased the apoptotic threshold *in vitro* and stimulated tumor growth *in vivo*. Adding extracellular PGE<sub>2</sub> in the culture medium failed to reproduce mPGES-1 effect on the cell viability *in vitro*. However, the intracellular injection of PGE<sub>2</sub> induced a dose-dependent apoptosis in GBM cultures which was dependent on the presence of Bax, a pro-apoptotic protein. We show that PGE<sub>2</sub> physically associates with Bax, triggering its apoptotic-like change in conformation and its subsequent association with mitochondria. Our results raise questions about the role of PGE<sub>2</sub> in the control of apoptosis and in its potential impact in central nervous system pathologies.

## Introduction

Cyclooxygenases (COX-1 and COX-2) are the enzymes responsible for the transformation of the arachidonic acid into prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) which is, in turn, converted into multiple prostanoids by specific enzymes (1). Prostaglandins are lipid mediators secreted and not usually stored, by many cells, either constitutively or in response to specific trauma, stimuli or signaling molecules. In the past decade, the role of COX-2 has been the topic of intense research, as epidemiological studies and clinical trials have indicated that the use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), potent inhibitors of COX-2, could decrease the incidence of certain malignancies such as colorectal, breast, lung and bladder cancers (2). However, severe cardiovascular and cerebral side effects have hampered the further use of specific COX-2 inhibitors. A better

knowledge on the importance and the relationships between the many signaling pathways downstream of COX-2 are thus crucial to understand the action of these inhibitors and to develop more efficient strategies on different pathologies (2).

In the brain, the situation of COX-2 appears to be particularly complex (3) as it is constitutively expressed under normal conditions contrary to other tissues and significantly elevated during neurodegenerative diseases (4) and tumorigenesis ((5, 6) (7) (8). The expression of COX-2 is regulated by physiological activity at the synaptic level and is strongly induced by the excessive activation of N-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptors and thus in glutamate excitotoxicity during cerebral ischemia. Of note, COX-2 deficient mice are less susceptible to both focal and global brain injury while they exhibit profound dysfunction of the kidney and the gastric tractus. The importance of COX-2 in the inflammatory process and its subsequent deleterious effects have been involved in both the neurodegenerative processes and the tumoral progression. However, data in the literature suggest that COX-2 could exert an antiapoptotic activity and this feature could be central for its tumorigenic property. These results suggest that COX-2 and possibly PGE<sub>2</sub> display distinct tissue-specific functions and/or physio-pathological situations.

The mechanism by which COX-2 could differently influence cell death is poorly defined but may be linked to the production of PGE<sub>2</sub> and not the production of reactive oxygen species (9). Indeed, several results have suggested that PGE<sub>2</sub> could trigger different and opposed responses depending on its concentration. For example, in the central nervous, PGE<sub>2</sub> can either induce apoptosis or be neuroprotective depending on its concentration (10) Takadera, 2002 #14; (11). The opposite functions could be related to the interaction of PGE<sub>2</sub> with different specific plasma membrane receptors called EP receptors. Kawano *et al.* (9) recently showed that PGE<sub>2</sub> induces neurotoxicity through one of its specific plasma membrane receptors (i.e. EP1) while other receptors (namely EP2, EP3 and EP4) are neuroprotective (11). This implies that PGE<sub>2</sub> can exert opposite effects on neurons depending on the cellular or the molecular context.

It has been suggested that PGE<sub>2</sub> may modulate tumoral growth by several means (i.e. apoptosis, metastasis, multidrug resistance, angiogenesis, and modulation of anti-

tumoral immune response) in several types of tumors (2). In brain tumors, a correlation between the overexpression of COX-2 and the grade of the tumour has been reported (6, 12). However, no statistical correlation between COX-2 expression and survival have been found in *glioblastoma multiforme*, the most aggressive brain tumors in adult (13). Microsomal Prostaglandin E<sub>2</sub> synthase-1 (mPGES-1) is the rate limiting enzyme which is responsible for the synthesis of PGE<sub>2</sub> downstream of COX-2 (14), but to our knowledge, the expression of this enzyme has not been studied in human *glioblastoma multiforme* patients. Thus, because of the fundamental role played by prostaglandin E<sub>2</sub> in the brain and its supposed role in tumoral growth, we have studied the expression of the two enzymes in the biosynthesis of PGE<sub>2</sub>, COX-2 and mPGES-1, in a retrospective clinical analysis realised on 60 patients with *glioblastoma multiforme*.

## Results

*The expression of mPGES-1 is correlated with a longer survival in GBM patients.*

We have investigated the role of this enzyme and its product PGE<sub>2</sub> on gliomas growth and cell death on 60 patients treated at the Department of Neurosurgery of the Hospital of Nantes over the years 1996–2001 (Supplementary Data 1). The expression of COX-2 and mPGES-1 was estimated by western blot in the tumoral sample and quantified as described in materials and methods. The amount of COX-2 appeared to be quite homogenous in the GBM analyzed (Fig. 1a, left). Inversely, two subpopulations could be clearly observed according to mPGES-1 expression, one of the enzymes implicated in the synthesis of PGE<sub>2</sub> downstream of COX-2 (15)(Fig. 1a, middle). We observed a correlation between the expression of mPGES-1 and the amount of PGE<sub>2</sub> measured in 10 tumors (Fig. 1a, right). This result was expected as mPGES-1 appears to be the rate-limiting enzyme in PGE<sub>2</sub> synthesis in many tissues. The mPGES-1 immunostaining was restricted to endothelial cells in the peritumoral tissue, while all tumoral cells were positively stained (Fig. 1b). The correlation between mPGES-1 expression in the tumor and the average survival of GBM patients was assayed by a Kaplan-Meier plot using the western

blots quantification of the enzyme as the variable. As shown in **Fig. 1c**, mPGES-1 high expression in GBM was found to be predictive of a longer survival (PGES H 23.31 months vs PGES L 12.41 months;  $p= 0.0254$ , unpaired two-tailed t-test). We noticed that among other variables (**Supplementary data 2**) there was a significant correlation between mPGES-1 expression in tumors and DEVDase activity in the tumoral extracts (**Fig. 1d**) ( $p<0.0001$ , Fisher's exact test) suggesting a positive correlation between the expression of mPGES-1 and apoptosis.

### ***mPGES-1 is apoptogenic in GBM primary cultures.***

We were able to generate several primary cultures from the GBM with high and low amount of PGES (respectively PGES-H and PGES-L) defined in **fig. 1a**. Of note, the expression of mPGES-1 was not altered in the primary cultures (**Fig. 2a**), suggesting that expression of mPGES-1 was intrinsic to the tumor and not induced by external factors such as inflammatory processes. To assess the relevance of this *in vivo* correlation between tumoral expression of mPGES-1 and apoptosis, we induced stable mPGES-1 overexpression in PGES H and PGES L primary cultures. Apoptosis was induced by staurosporine (150 nM for 12 h) and its induction estimated by the quantification of the DEVDase activity as previously described (16). As shown in **figure 2a**, the overexpression of mPGES-1 induced an increase in both spontaneous and STS-induced apoptosis. The primary cultures from GBM PGES L and GBM PGES H as well as stable transfectants for mPGES-1 were injected in the flank of immunodeficient nude mice. As shown in **figure 2b**, PGES L tumors grew faster than the PGES H tumors. When PGES L GBM were transfected by a mPGES-1 plasmid, the tumoral growth was reduced to a level similar to that of GBM PGES H tumors.

The down-regulation of the expression of mPGES-1 was achieved by the transfection of shRNA in PGES L primary cultures. The efficiency of mPGES-1 knock-down and the subsequent decrease in PGE<sub>2</sub> synthesis were verified by FACS analysis and by EIA assay respectively (Supplementary figure 3). shRNA transfected cells were treated by staurosporine and apoptosis estimated by the quantification of DEVDase activity.

**Figure 2c** shows that the mPGES-1 knock-down renders the cells resistant to apoptosis. Inversely, COX-2 down-regulation increased the sensitivity of the cells to staurosporine (**fig. 2c**). These results suggest that COX-2 and mPGES-1 exert opposite effects on apoptosis.

These shRNA GBM cells were injected subcutaneously to nude mice, each mouse receiving control cells (treated with control shRNA) injection in the controlateral flank (**Fig. 2d**). mPGES-1 knock-down drastically increased the growth of GBM in nude mice (**Fig. 2d**), similar results were obtained with two different shRNA (**data not shown**).

*Intracellular PGE<sub>2</sub> is a potent inducer of apoptosis.*

We next examined the implication of PGE<sub>2</sub>, mPGES-1 product, in the GBM cells apoptosis. Transfection of primary culture with mPGES-1 induces an increase in the biosynthesis of PGE<sub>2</sub> (fig. 3a). Treatment of Bax-expressing GBM (BeGBM) primary cultures with extracellular PGE<sub>2</sub> neither induced cell death nor sensitized the cells to apoptosis (Fig. 3b). Since PGE<sub>2</sub> was also observed in the cellular compartment of GBM (Supplementary figure 3), we investigated the role of intracellular PGE<sub>2</sub> in apoptosis. Most cells exhibit a very efficient exclusion mechanism of PGE<sub>2</sub> which has been shown to be partially mediated by the multiple drug resistance protein MRP4 and to be inhibited by ketoprofen (17). PGE<sub>2</sub> is rapidly inactivated *in vivo* by the action of 15-hydroxy prostaglandin dehydrogenase (15-hydroxy PGDH) which is selectively inhibited with CAY10397. This inhibition prolongs the lifetime and activity of endogenously produced prostaglandins both in cell culture and *in vivo* (18). Of note, it seems that PGE<sub>2</sub> catabolism by 15-PGDH no more happens in the brain after birth; PGE<sub>2</sub> is then secreted through the blood-brain barrier (Kronic DevBrainRes00). PGE<sub>2</sub> and its derivatives are usually known to signal through the activation of various transcriptional pathways following the binding of receptors, including the EP receptors and the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) (11). To increase the intracellular concentration of PGE<sub>2</sub> we treated GBM primary cultures by a combination of drugs, including actinomycin D to prevent the transcription induced by PGE<sub>2</sub>, CAY10397 to inhibit its metabolic

inactivation and ketoprofen to inhibit PGE<sub>2</sub> exportation. In the presence of this regimen, the spontaneous apoptosis is increased in a PGE<sub>2</sub>-dependent manner (fig. 3d). This result suggests that increasing the intracellular PGE<sub>2</sub> concentration is sufficient to induce apoptosis. PGE<sub>2</sub> microinjection into the cytoplasm of BeGBM cells, which artificially increases the intracellular amount of PGE<sub>2</sub>, (see materials and methods), induced a dose-dependent cell death within 5h (Fig. 4a). The dying cells exhibited the classical morphological features of apoptotic cells with membrane blebbing and chromatin condensation (Fig. 4a, inset). PGD<sub>2</sub>, the other major prostaglandin in the nervous system, induced no cell death when microinjected under similar conditions (Fig. 4b, graph and inset), showing the specificity of the PGE<sub>2</sub> induced apoptosis. Of note, PGE<sub>2</sub>-induced cell death was not inhibited by actinomycin D (Fig. 4c) ruling out (together with extracellular treatment (fig. 3b)) the involvement of the receptors pathways signaling through transcriptional activation.

Because Bax is central in GBM apoptosis (19), we investigated its implication in intracellular PGE<sub>2</sub>-induced apoptosis. Bax-expressing GBM cells (BeGBM) were microinjected with PGE<sub>2</sub> and then probed with a conformation-specific antibody (6A7 antibody) which recognizes only the active conformation of Bax (20), As shown in Figure 4d, the GBM cells microinjected with PGE<sub>2</sub> were labelled by the 6A7 antibody, suggesting that Bax was activated by the microinjection of PGE<sub>2</sub>. As a control we used PGD<sub>2</sub> and no activation of Bax was observed under these conditions (data not shown).

#### *The intracellular PGE<sub>2</sub>-induced apoptosis is Bax-dependent.*

The involvement of Bax in PGE<sub>2</sub>-induced apoptosis was first suggested by the fact that the overexpression of mPGES-1 in Bax-deficient GBM (BdGBM) primary cultures (19) did not affect the response of these cells to staurosporine-induced apoptosis (Fig. 5a). The microinjection of PGE<sub>2</sub> failed to induce cell death in these cells (Fig. 5b) but the ectopic expression of Bax (BdGBM-Bax), which restores the apoptotic sensitivity of these cells (Supplementary fig. 4), also reinstates cell death induced by PGE<sub>2</sub> microinjection (Fig. 5b, closed bars). The cell-permeant peptide BIP was shown by Sawada *et al.* (21) to

inhibit Bax translocation to the mitochondria and Bax-dependent apoptosis. The addition of BIP (200  $\mu$ M, 1 hour prior to microinjection) inhibits PGE<sub>2</sub>-induced apoptosis in BeGBM (**Fig. 5c**). Bcl2 is a cellular antiapoptotic protein, and a functional antagonist of Bax (22). Bax-expressing GBM overexpressing Bcl2 (BeGBM-Bcl2) were efficiently protected from PGE<sub>2</sub>-induced apoptosis, even when very high concentrations of PGE<sub>2</sub> were injected (Fig. 5d).

*PGE<sub>2</sub> directly induces an apoptotic change of conformation of Bax.*

To further identify the molecular events underlying the Bax dependency of PGE<sub>2</sub>-induced apoptosis, we used isolated rat liver mitochondria incubated with IVT <sup>35</sup>S radiolabeled Bax with increasing concentrations of PGE<sub>2</sub>. Bax does not spontaneously associate with mitochondria under these conditions unless it is activated by proapoptotic signals such as Bid (23). The amount of mitochondria-associated Bax was analysed by PhosphorImager and quantified by the ImageJ software (see Materials and Methods). As shown on the graph (Fig. 6a), PGE<sub>2</sub> induced Bax translocation and membrane insertion to the mitochondria in a dose-dependent way. Quite remarkably, PGE<sub>2</sub> led to the full integration of IVT Bax in the mitochondria as viewed by its resistance to alkaline treatment (Fig. 6b). On the other hand, no effect were observed with PGD<sub>2</sub> under these circumstances (Fig. 6b). The integration of Bax into mitochondria suggests that Bax undergoes an apoptotic-like change of conformation upon its incubation with PGE<sub>2</sub>. This contention was assessed by differential immunoprecipitation with the 2D2 and the 6A7 anti-Bax antibodies. As shown in figure 6d, PGE<sub>2</sub> induced the recognition of Bax by the anti-conformational antibody 6A7. To further determinate the nature of PGE<sub>2</sub> /Bax interaction, recombinant Bax was incubated with acetylcholine esterase (AChE)-coupled PGE<sub>2</sub> or with an equivalent amount of AChE. After incubation, Bax was immunoprecipitated and AChE activity was measured in the immunoprecipitated fraction. Non-specific AChE activity (i.e. AChE not bound to PGE<sub>2</sub> co-immunoprecipitated with Bax) was subtracted to the values as shown in supplementary figure 5. PGE<sub>2</sub> was recovered in

Bax-associated pellet in a dose-dependent way (Fig. 6d) suggesting a direct physical interaction between PGE<sub>2</sub> or PGE<sub>2</sub>-derived products and Bax.

## Discussion

An increase in COX-2 activity represents a common mechanism in several types of neurotoxic insults involved in both acute and chronic neurological diseases through the synthesis of a wide variety of prostanoids, which exert multiple and sometimes contradictory functions through G protein-coupled receptors (9) (4) (24, 25). COX-2-derived prostaglandins have potent inflammatory properties. Well, chronic inflammation condition is now considered as a risk factor in colon cancer, so is it in neurodegenerative and in cardiovascular diseases. However, in colon cancer cell lines, the elevated extracellular concentration of PGE<sub>2</sub> has been shown to modulate the expression of the antiapoptotic protein Bcl2 (26) or to transactivate the EGFR and enhance AKT activity (27), which in both cases results in reduced Bax translocation to the mitochondria. On the other hand, COX-2 activity appears to be involved in the proapoptotic action of cannabinoids derivatives both in brain and in colorectal tumors (28, 29) and Bcl2 inhibits the PGE<sub>2</sub>-mediated apoptosis in B-cell lymphomas (30). The latter results suggest a complex role of COX-2 and PGE<sub>2</sub> in the control of tumoral cell survival. In this work, we have investigated the expression of the two major enzymes involved in the biosynthesis of PGE<sub>2</sub> in brain, COX-2 and mPGES-1, in *glioblastoma multiforme* (GBM), the most aggressive form of gliomas. We found that the expression of COX-2 was homogenous in all the 60 GBM examined while on the other hand, these tumors could be divided in two distinct groups by the amount of mPGES-1 expressed: PGES H (high level) and PGES L (low level) (fig. 1). Roughly, 32% of the GBM expressed a high amount of PGES and most tumoral cells were labelled by an antibody specific of the enzyme. The expression of mPGES-1 was found to be a significant predictor of survival in GBM patients (Fig. 1c). Quite remarkably, PGES H GBM exhibited high caspase 3 activities (fig. 1d), suggesting that mPGES-1 was associated with an apoptotic phenotype. The latter contention was

confirmed by studies with mPGES-1-transfected primary cultures in which both spontaneous and induced apoptosis were augmented (fig 2a) and *in vivo* growth considerably reduced (fig. 2b). Conversely, silencing mPGES-1 expression by shRNA decreased the threshold of apoptotic sensitivity of the primary cultures and increased their *in vivo* growth in the nude mice (fig. 2c, d). Of note, the extinction of COX-2 by shRNA in the primary cultures had a strictly opposite effect, as apoptosis was augmented (fig. 2c) and the growth *in vivo* considerably altered (data not shown). It is noteworthy that mPGES-1 is identical to a p53-induced gene (PIG12) which has been identified as being involved in p53 proapoptotic response through the control of the oxidative stress (31, 32). Next, we have verified that the overexpression of mPGES-1 effectively led to an increase of PGE<sub>2</sub> synthesis (fig. 3a). However, the addition of PGE<sub>2</sub> in the culture medium did not trigger apoptosis in the GBM primary cultures, ruling out the involvement of the EP receptors in the mPGES-1 induced apoptosis (Fig. 3b). On the other hand, increasing the intracellular PGE<sub>2</sub> by pharmacological means (Fig. 3c, d) or by microinjection (Fig. 4) increased apoptotic cell death in a Bax-dependent fashion (Fig. 5). Quite interestingly, the closely related prostaglandin PGD<sub>2</sub> had no effects in the induction of apoptosis when microinjected in the same conditions as PGE<sub>2</sub> (Fig. 5b). We used a simplified system to analyze Bax-dependent apoptosis in which purified or *in vitro* synthesized Bax was incubated in the presence of isolated rat liver mitochondria (see for example (33)) and its apoptotic-like membrane insertion analyzed by centrifugation. The addition of PGE<sub>2</sub> to this system led to a dose-dependent membrane association/integration of Bax (Fig. 6 a, b), a feature also found when Bax was incubated with BH3-only proteins or by lowering pH, two allegedly Bax apoptotic activators (23, 33). As shown in fig. 6c, d, PGE<sub>2</sub>/Bax physical interaction caused a conformational change, shown by the immunoprecipitation by the 6A7 antibody which recognizes an epitope normally hidden at the N-terminus of the protein, which exposure is usually associated with Bax insertion into mitochondrial membranes during apoptosis (20, 34). Direct modulation of proteins activity by derivatives of PGH<sub>2</sub>, such as the cyclopentenone prostaglandins (i.e. 15-deoxy- $\Delta^{12-14}$

PGJ<sub>2</sub>)(35), has been shown but our work is, to our knowledge, the first report of a proapoptotic intracellular PGE<sub>2</sub> target.

COX-2 expression has been associated with a poor prognosis in numerous types of cancers including colorectal tumors (36) and gliomas (6) and numerous results have suggested that the anti-apoptotic properties of COX-2 played an important role in tumor development (36, 37). However, our data show the existence of a new mechanism of activation of Bax through its physical interaction with PGE<sub>2</sub>. These findings raise the question of the relative importance of the balance between extracellular and intracellular PGE<sub>2</sub> in the control of apoptosis. The nature and the mechanism involved in the conformational change of Bax triggered by PGE<sub>2</sub> have to be further evaluated. However, our finding that PGE<sub>2</sub> can directly affect proteins involved in apoptosis could be important in the debate on the deleterious and/or beneficial effects of inhibiting the production of prostanoids.

## **Materials and methods.**

### **Materials.**

Antibodies were purchased from indicated companies: COX-2 (Cayman, 160107), actin (Chemicon, MAB1501R), Bax 2D2 (amino-acids 3-16, Sigma, B8554), Bax 6A7 (amino-acids 12-24, ABCAM, ab5714), Bcl2 (DAKO, M0887), F<sub>1</sub>-ATPase (Molecular Probes, A-21350). mPGES-1 cDNA and polyclonal antibody directed against mPGES-1 were obtained as described earlier(38). <sup>35</sup>S-Met (Amersham, France) labeled proteins were synthesized from cDNAs using the TNT-coupled transcription/translation system from Promega (France). 15-PGDH inhibitor (CAY10397) was purchased from Cayman (70130). BIP peptide was synthesized by Sigma Genosys (VPMLK, Sawada et al. 2003). Unless mentioned, chemical products and reagents were obtained from Sigma (France).

Immunoblots were quantified using the ImageJ software (NIH, USA).

Every experiment was repeated at least 3 independent times.

Statistical analyses were performed using the GraphPad software (San Diego, CA 92130 USA).

### **Patients.**

Patient material as well as records (diagnosis, age, sex, date of death) were used with confidentiality according to French laws and recommendations of the French National Committee of Ethic.

Tumor samples were collected from adult patients after surgical resection or biopsy at the Department of Neurosurgery of the Hospital of Nantes over the years 1996–2001.

Brain tumors were examined by two expert pathologists and graded according to the WHO system, on the basis of tumor cell types, mitotic index, cytoplasmic abnormalities, endothelial cell proliferation and necrosis. Control tissue was obtained from normal brain tissue found at the periphery of the resected tumor, or from control tissue from patients operated for other pathologies at the Department of Neurosurgery.

### **Immunohistochemistry.**

The cellular expression of mPGES-1 was assessed by immunohistochemistry (IHC) using a specific antibody provided by Pr Jakobsson (Karolinska Institutet, Sweden) visualized by the avidin biotin complex method. Cryosections of 6  $\mu\text{m}$  were obtained with a LEICA CM 1900 cryostat, then air dried and fixed in cold acetone for 10 minutes. After treatment with 0.03%  $\text{H}_2\text{O}_2$  in methanol to block endogenous peroxidase activity, the sections were incubated with 3% BSA-PBS for 15 mn prior incubation with primary antibody diluted in 0.1% BSA-PBS. Incubation at 4°C overnight was followed by corresponding biotinylated antibody for 30 mn at room temperature before revelation by 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC, Vector Laboratories, Burlingame, California, USA). Sections incubated without a primary antibody were used as a negative control. All sections were counterstained in Mayer's haematoxylin.

### **Cell culture and transfections.**

Human BeGBM and BdGBM cells were obtained as described previously (19). For overexpression experiments, transfections were done using indicated cDNA subcloned into pDEST12.2 vector (Invitrogen). Plasmid DNA (5  $\mu\text{g}$ ) was introduced into  $10^6$  BdGBM or BeGBM cells by electroporation (GenePulser, Bio-Rad) using 200 V/cm and 250 $\mu\text{F}$ .

For knock-down experiments, shRNA sequences were designed using Ambion's siRNA target finder software and were cloned into pSilencer<sup>TM</sup> 2.1-U6 hygro vector (Ambion). The sequences used were following: siPGES: 1= siRNA I.D. #15440, 2= siRNA I.D. #15446; siCOX-2: 1= sense strand GCCUUCUCUAACCUCUCCUtt, antisense strand AGGAGAGGUUAGAGAAGGctt, 2= sense strand CCGAGGUGUAUGUAUGAGUtt, antisense strand ACUCAUACAUACACCUCGGtt . Control shRNA was furnished by the manufacturer and was designed as a non-targeting shRNA. Plasmid DNA (10  $\mu\text{g}$ ) was introduced as described above.

The transfected cells were selected in a medium containing neomycin (250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) or hygromycin B (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

### **Tumor xenografts.**

For *in vivo* experiments,  $5 \times 10^5$  cells were injected subcutaneously into 5 male Swiss Nude mice (Charles River, France). Control cells containing a non-targeting shRNA (Ambion) were injected in the contralateral flank of each mouse. Tumor volume was measured twice a week.

**Caspase activation assay.** Total cell lysates were done and protein concentrations were measured by the Bradford technique. DEVDase activity was measured using the fluorometric CaspACE Assay System (Promega) and normalized to the sample protein concentration as described previously (39).

**PGE<sub>2</sub> internalisation experiments.**

BeGBM primocultures were plated the day before treatment. PGE<sub>2</sub> (10 μM) and actinomycin D (20 ng/ml) were added to the culture medium. After 10mn, CAY10397 (15 μM) and ketoprofen (1 μM (40)) were added, and cells were treated for 18h. Cell death was then assessed by trypan blue staining and normalized to the cell death induced by the inhibitors without extracellular PGE<sub>2</sub> addition.

**Microinjection experiments.**

Microinjection was performed as described by Cartron *et al.* (23). Prostaglandins were co-injected with a dextran coupled to a fluorochrome (Oregon Green, Molecular Probes). The percentage of fluorescent cells exhibiting morphological apoptotic features was evaluated every hour following PGE<sub>2</sub> microinjection using an inverted fluorescent microscope (DMIRE2, Leica France). When indicated, actinomycin D was added in the cell culture 30 mn prior to the injection (20 ng/ml).

**Confocal analysis.**

For confocal analysis, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde-0.19% picric acid for 30 mn at room temperature. After washing with PBS, the cells were permeabilized with 0.1% SDS-PBS for 10 mn RT, then saturated by 5% gelatin-PBS for 15 mn RT. The cells were incubated with indicated antibodies for 1h RT in 1% gelatin-PBS. The secondary antibodies used were coupled to a fluorochrome (Alexa 568 or 633, Molecular Probes). Images were collected on a Leica TCS NT microscope with a 63x 1.3 NA Fluotar objective (Leica, France).

**Cell free assay for Bax insertion.**

Mitochondria were prepared from normal rat liver and the cell-free association of Bax with the mitochondria was performed as described previously (23). <sup>35</sup>S-Met-labeled Bax (2 fmol), PGE<sub>2</sub> and isolated rat liver mitochondria (100 μg mitochondrial proteins) were incubated in a standard import buffer for 1h at 30°C. Mitochondria were pelleted and samples were separated by SDS-PAGE. Gels were fixed and dried, and <sup>35</sup>S-labeled Bax was detected on a PhosphorImager scanner.

**PGE<sub>2</sub>-AChE Bax assay.**

Full-length Histidine-tagged human Bax was purified as described previously (19). 100 ng 6xHis-Bax was incubated with PGE<sub>2</sub>-AChE 1h at 30°C in BSA-saturated tubes to avoid aspecific interactions. IP was performed with anti-Bax 2D2 antibody coupled to Zysorbin G according to the manufacturer's instructions (ZYMED). Three additional washes with washing buffer were performed before Ellman's AChE activity was determined on the IP pellet. Plates were read at 415 nm.

#### **PGE<sub>2</sub> immunoassay.**

The amount of PGE<sub>2</sub> was measured in cells lysates and culture medium using the PGE<sub>2</sub> Biotrak EIA System (Amersham Biosciences) according to the manufacturer instructions. 10<sup>4</sup> cells were plated in 96 well plates the day before. Plates were read at 450 nm. PGE<sub>2</sub> concentrations were normalized to the protein concentration of the samples

#### **References**

1. Cha, Y.I., Solnica-Krezel, L., and DuBois, R.N. 2006. Fishing for prostanoids: Deciphering the developmental functions of cyclooxygenase-derived prostaglandins. *Developmental Biology* 289:263-272.
2. Wang, D., and DuBois, R.N. 2006. Prostaglandin and cancer. *Gut* 55:115-122.
3. Musiek ES, M.G., McLaughlin B, Morrow JD. . 2005. Cyclopentenone eicosanoids as mediators of neurodegeneration: a pathogenic mechanism of oxidative stress-mediated and cyclooxygenase-mediated neurotoxicity. *Brain Pathology* 15:149-158.
4. Herrmann, O., Baumann, B., de Lorenzi, R., Muhammad, S., Zhang, W., Kleesiek, J., Malfertheiner, M., Kohrmann, M., Potrovita, I., Maegele, I., et al. 2005. IKK mediates ischemia-induced neuronal death. *Nat Med* 11:1322-1329.
5. Williams, C.S., Tsujii, M., Reese, J., Dey, S.K., and DuBois, R.N. 2000. Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. *J. Clin. Invest.* 105:1589-1594.
6. Shono, T., Tofilon, P.J., Bruner, J.M., Owolabi, O., and Lang, F.F. 2001. Cyclooxygenase-2 Expression in Human Gliomas: Prognostic Significance and Molecular Correlations. *Cancer Res* 61:4375-4381.
7. Castellone, M.D., Teramoto, H., Williams, B.O., Druey, K.M., and Gutkind, J.S. 2005. Prostaglandin E2 Promotes Colon Cancer Cell Growth Through a Gs-Axin- $\beta$ -Catenin Signaling Axis. *Science* 310:1504-1510.
8. Gupta, R.A., and DuBois, R.N. 2001. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase 2. *Nature Reviews Cancer* 1:11-21.
9. Manabe, Y., Anrather J., Kawano T., Niwa K., Zhou P., Ross M.E., Iadecola C. 2004. Prostanoids, not reactive oxygen species, mediate COX-2-dependent neurotoxicity. *Annals of Neurology* 55:668-675.
10. Chen, C., and Bazan, N.G. 2005. Endogenous PGE2 Regulates Membrane Excitability and Synaptic Transmission in Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons. *J Neurophysiol* 93:929-941.
11. McCullough, L., Wu, L., Haughey, N., Liang, X., Hand, T., Wang, Q., Breyer, R.M., and Andreasson, K. 2004. Neuroprotective Function of the PGE2 EP2 Receptor in Cerebral Ischemia. *J. Neurosci.* 24:257-268.
12. Hara, A., and Okayasu, I. 2004. Cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in human astrocytic gliomas: correlation with angiogenesis and prognostic significance. *Acta Neuropathologica* 108:43-48.
13. Buccoliero AM, C.A., Gheri CF, Taddei A, Paglierani M, Pepi M, Mennonna P, Taddei GL. 2006. Inducible cyclooxygenase (COX-2) in glioblastoma--clinical and immunohistochemical (COX-2-VEGF) correlations. *Clin Neuropathol.* 25:59-66.

14. Park, J.Y., Pillinger, M.H., and Abramson, S.B. Prostaglandin E2 synthesis and secretion: The role of PGE2 synthases. *Clinical Immunology* In Press, Corrected Proof.
15. Kudo, I., and Murakami, M. 2005. Prostaglandin E Synthase, a Terminal Enzyme for Prostaglandin E2 Biosynthesis. *J Biochem Mol Biol.* 38: 633~638.
16. Cartron, P.F., Juin, P., Oliver, L., Martin, S., Meflah, K., and Vallette, F.M. 2003. Nonredundant role of Bax and Bak in bid-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* 23:4701-4712.
17. Reid, G., Wielinga, P., Zelcer, N., van der Heijden, I., Kuil, A., de Haas, M., Wijnholds, J., and Borst, P. 2003. The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *PNAS* 100:9244-9249.
18. Berry, C.N., Hoult, J.R.S., Peers, S.H., and Agback, H. 1983. Inhibition of prostaglandin 15-hydroxydehydrogenase by sulphasalazine and a novel series of potent analogues. *Biochemical Pharmacology* 32:2863-2871.
19. Cartron, P.-F., Juin, P., Oliver, L., Martin, S., Meflah, K., and Vallette, F.M. 2003. Nonredundant Role of Bax and Bak in Bid-Mediated Apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 23:4701-4712.
20. Hsu, Y.T., Wolter, K.G., and Youle, R.J. 1997. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3668-3672.
21. Sawada, M., Sun, W., Hayes, P., Leskov, K., Boothman, D.A., and Matsuyama, S. 2003. Ku70 suppresses the apoptotic translocation of Bax to mitochondria. *Nat Cell Biol* 5:320-329.
22. Cory, S., and Adams, J.M. 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2:647-656.
23. Cartron, P.F., Gallenne, T., Bougras, G., Gautier, F., Manero, F., Vusio, P., Meflah, K., Vallette, F.M., and 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.
24. Hunot, S., Vila, M., Teismann, P., Davis, R.J., Hirsch, E.C., Przedborski, S., Rakic, P., and Flavell, R.A. 2004. JNK-mediated induction of cyclooxygenase 2 is required for neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *PNAS* 101:665-670.
25. Teismann, P., Tieu, K., Choi, D.-K., Wu, D.-C., Naini, A., Hunot, S., Vila, M., Jackson-Lewis, V., and Przedborski, S. 2003. Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration. *PNAS* 100:5473-5478.
26. Kawai, N., Tsujii, M. & Tsuji, S. 2002. Cyclooxygenases and colon cancer. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69: 187-196.
27. Tessner, T.G., Muhale, F., Riehl, T.E., Anant, S., and Stenson, W.F. 2004. Prostaglandin E2 reduces radiation-induced epithelial apoptosis through a mechanism involving AKT activation and bax translocation. *J. Clin. Invest.* 114:1676-1685.
28. Hinz, B., Ramer, R., Eichele, K., Weinzierl, U., and Brune, K. 2004. Up-Regulation of Cyclooxygenase-2 Expression Is Involved in R(+)-Methanandamide-Induced Apoptotic Death of Human Neuroglioma Cells. *Mol Pharmacol* 66:1643-1651.
29. Patsos, H.A., Hicks, D.J., Dobson, R.R.H., Greenhough, A., Woodman, N., Lane, J.D., Williams, A.C., and Paraskeva, C. 2005. The endogenous cannabinoid, anandamide, induces cell death in colorectal carcinoma cells: a possible role for cyclooxygenase 2. *Gut* 54:1741-1750.
30. Brown, D.M., and Phipps, R.P. 1996. Bcl-2 expression inhibits prostaglandin E2-mediated apoptosis in B cell lymphomas. *J Immunol* 157:1359-1370.
31. Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. 1997. A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 389:300-305.
32. Jakobsson, P.J., Morgenstern, R., Mancini, J., Ford-Hutchinson, A., and Persson, B. 1999. Common structural features of MAPEG -- a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. *Protein Sci* 8:689-692.

33. Cartron, P.F., Gallenne, T., Bougras, G., Gautier, F., Manero, F., Vusio, P., Khaled, M., Vallette, F.M., and Juin, P. 2004. The first 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.
34. Hsu, Y.T., and Youle, R.J. 1997. Nonionic detergents induce dimerization among members of the Bcl-2 family. *J Biol Chem* 272:13829-13834.
35. Perez-Sala, D., Cernuda-Morollon, E., and Canada, F.J. 2003. Molecular Basis for the Direct Inhibition of AP-1 DNA Binding by 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2. *J. Biol. Chem.* 278:51251-51260.
36. Gupta, R.A., and Dubois, R.N. 2001. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat Rev Cancer* 1:11-21.
37. Gasparini, G., Longo, R., Sarmiento, R., and Morabito, A. 2003. Inhibitors of cyclo-oxygenase 2: a new class of anticancer agents? *Lancet Oncol* 4.:605-615.
38. Jakobsson, P.J., Thoren, S., Morgenstern, R., and Samuelsson, B. 1999. Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7220-7225.
39. Juin, P., Tremblais, K., LeCabellec, M.T., Gregoire, M., Meflah, K., and Vallette, F.M. 1998. Potentiation of apoptosis by mitochondria in a cell-free system. *Biochem Biophys Res Commun* 253:185-191.
40. Reid, G., Wielinga, P., Zelcer, N., van der Heijden, I., Kuil, A., de Haas, M., Wijnholds, J., and Borst, P. 2003. The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9244-9249.

## Legends of figures

**Figure 1: A high expression of m-PGES 1 is associated with increased apoptosis and decreased tumoral progression in Glioblastoma multiforme.** **a:** COX-2 (left panel) and mPGES-1 (middle panel) expression were assessed in 60 human GBM by western blot in total tumoral extracts. The immunoblots were quantified by ImageJ and the expression of each protein was normalized by  $\beta$ actin. Right panel : PGE<sub>2</sub> amount was measured in 10 tumors (5 with a high mPGES-1 level, PGES H, closed marks, and 5 with a low mPGES-1 level, PGES L, open marks) by EIA and normalized by the corresponding protein concentration. **b:** mPGES-1 tissue localization was assessed by immunohistochemistry (magnification x100). Positively stained cells appear brown-coloured. A field of the tumorous region and of the safe tissue were enlarged on the right (magnification x400). The image shown is representative of 3 different tumors. **c:** Survival curves were established by the Kaplan-Meier plot to compare the two groups of patients determined in **a**: high mPGES-1 (PGES H; closed marks) and low mPGES-1 level (PGES L; open marks). **d:** correlation between mPGES-1 expression and the DEVDase activity measured in tumor lysate (high and low DEVDase: values inferior (low) or superior (high) to 3 fold the average values measured in control brain tissue).

**Figure 2: The expression of *mPGES-1* modulates the sensitivity of GBM primary cultures to STS-induced apoptosis. a:** GBM primary cultures derived from tumors

with different amount of mPGES-1 (PGES L and PGES H) were transfected with a plasmid encoding for mPGES-1 cDNA (T) or mock transfected (M) to obtain stable transfectants. **b:** The latter primary cultures were subjected to STS-induced apoptosis (150 nM, 12 h). Spontaneous and STS-induced apoptosis were materialized by the measurement of caspase 3 activation in total lysates. **c:** The latter primary cultures were xenotransplanted in nude mice. Tumor volume was measured twice a week. **d:** Conversely, PGES H primary cultures were treated with shRNA targetting mPGES-1 or COX-2 and their sensitivities toward STS estimated (STS, 150 nM, 12 h). DEVDase activity was measured in treated and untreated cells. \* :  $p \leq 0.01$ . **e:** BeGBM cells down-regulating mPGES-1 were injected subcutaneously to nude mice while the control cells were injected into the opposite flank. Tumor volume was measured twice a week over a 2-weeks period. The results presented in **d** and **e** are illustrative experiments obtained for at least 2 different shRNAs per conditions.

**Figure 3: Intracellular PGE<sub>2</sub> induces a transcription-independent apoptosis in BeGBM cells.** **a:** The expression of PGE<sub>2</sub> was estimated from the cellular extracts and the culture media (data not shown) of cells expressing low or high amount of mPGES-1 by ELISA (see materials and methods). The amount of PGE<sub>2</sub> was proportional to the amount of mPGES-1 expressed by the cells. **b:** PGE<sub>2</sub> was added in BeGBM cells culture for 24h and cell viability was assessed by trypan blue exclusion (open bars). Alternatively, cell viability was measured in BeGBM treated with PGE<sub>2</sub> 1h prior staurosporine addition (STS, 150 nM, 12 h) (closed bars). **c:** scheme of the pharmacological treatment design to increase the intracellular concentration of PGE<sub>2</sub>: ketoprofen was used to block the export of PGE<sub>2</sub> to the culture medium and CAY10397 to block the inactivation of PGE<sub>2</sub> (see the text). Actinomycin D was used to prevent the transcription-dependent action of PGE<sub>2</sub> through receptors. **d:** the mere action of the inhibitors increased the spontaneous amount of cell death in treated cells, this effect was specifically enhanced by the addition of PGE<sub>2</sub>.

**Figure 4: The microinjection of PGE<sub>2</sub> triggers apoptosis and induces Bax change of conformation.** **a:** PGE<sub>2</sub> was microinjected into BeGBM cells, with the green fluorescent dye as a marker. The percentage of apoptotic cells measured by morphological criteria (inset) was calculated every hour following the microinjection. **b:** PGD<sub>2</sub> was similarly microinjected but in this case no cells with apoptotic features were observed (inset). **c:** BeGBM cells were treated by actinomycin D (ActD) at a transcription-inhibiting concentration (20 ng/ml), 30 min prior to PGE<sub>2</sub> injection. PGE<sub>2</sub> microinjection experiments with or without actinomycin D were coupled. **d:** laser confocal microscopy image of a PGE<sub>2</sub>-microinjected BeGBM cell (green) stained with the

conformation-specific 6A7 anti-Bax antibody (red). F<sub>1</sub>-ATPase was used as a positive control to visualize the non-microinjected cells in the field.

**Figure 5: PGE<sub>2</sub>-induced apoptosis is a Bax-dependent event.** **a:** Bax-deficient GBM cells (BdGBM) were transfected (+) with a plasmid encoding for mPGES-1 cDNA or mock-transfected (-). mPGES-1 overexpression was determined by western blot (data not shown) and DEVDase activity was measured in the cell lysate with or without staurosporine treatment (STS, 150 nM, 12 h) as in **figure 2b**. **b:** PGE<sub>2</sub> microinjection was performed into BdGBM (open bars) or Bax-transfected BdGBM cells (BdGBM-Bax, closed bars). Bax expression reinstates PGE<sub>2</sub>-induced cell death of BdGBM cells. **c:** BIP pentapeptide (VPMLK) was added in BeGBM cell culture 1h prior PGE<sub>2</sub> microinjection. The percentage of apoptotic cells was determined every hour following microinjection. Cell death is significantly lower in BIP-treated cells 5h after microinjection (p<0.002). **d:** Bcl2 overexpression was induced by transfection in BeGBM cells (BeGBM-Bcl2). A death-inducing concentration of PGE<sub>2</sub> (20 μM or 200 μM) was injected into BeGBM-Bcl2 cells. Percentage of apoptotic cells were determined every hour for 5 h. \* : p<0.01.

**Figure 6: PGE<sub>2</sub> promotes Bax association in an acellular system and is immunoprecipitated with recombinant Bax in vitro.** **a:** IVT radiolabelled Bax was incubated with isolated mitochondria and increasing amounts of PGE<sub>2</sub>. The amount of mitochondria-associated Bax was determined after SDS-PAGE of the mitochondrial pellet and analysis on PhosphorImager and quantification by ImageJ. The quantification graph was established from 3 independent experiments. **b:** experiments were similar to that described in **a**, but the insertion of Bax into mitochondrial membranes was assessed by an alkaline treatment (closed bars). Bax was similarly treated with PGD<sub>2</sub> (open bars) **c:** IVT-Bax was incubated with the indicated prostaglandins, then immunoprecipitated using the 6A7 and the 2D2 antibodies and Zysorbin G. IP(+)= immunoprecipitation; IP(-)= absence of immunoprecipitation. Triton-X 100 was added to artificially induce Bax activation and exposure of the 6A7 epitope. The resulting precipitates were analyzed by 12% SDS-PAGE and autoradiography. **d:** Recombinant Bax was incubated with PGE<sub>2</sub>-AChE or with an equivalent amount of AChE prior immunoprecipitation with an anti Bax antibody (**supplementary data 5**). Bax-associated PGE<sub>2</sub> was detected by the PGE<sub>2</sub>-specific AChE activity in the immunoprecipitated fraction (see materials and methods). The graph is representative of 4 independent experiments. \* : p<0.001 ; \*\* : p=0.002

## **SUPPLEMENTARY DATA**

### **Supplementary data 1: Clinical data from 60 GBM patients.**

Clinical data were collected from the Department of Neurosurgery of the Hospital of Nantes over the years 1996–2001 after surgery (F: female ; M: male ; B: biopsy ; TR : total resection). Molecular biomarkers were established by western blot analysis (NA : not applicable, Bax-deficient tumors). Protein expression levels were normalised by  $\beta$ actin.

### **Supplementary data 2: Statistical analysis of patients survival.**

Statistical analysis was performed to test the correlation between survival and clinical variables or molecular biomarkers (t-test, according to the GraphPad software). No correlations could be made between sex or surgery and patients' survival ( $p > 0.05$ ). The 3 biomarkers studied here are statistically correlated to patients' survival ( $p < 0.05$ ). Bax-deficient tumors were excluded from statistics (Bax/Bcl2 ratio and mPGES-1 expression) because we have shown previously (HumMolGenet) that the poor prognosis was attributable to Bax deficiency.

### **Supplementary data 3: Efficiency of mPGES-1 knock-down in BeGBM.**

**a:** FACS analysis. Cells were fixed (paraformaldehyde 4%) and stained with an anti-mPGES-1 antibody, then by a secondary antibody coupled to a fluorochrome (Alexa 488). All incubation and washing steps were realised in PBS / BSA 0.1% / saponin 0.1% at room temperature. Fluorescence detection and analysis were performed on a FACScalibur cytometer with the CellQuest Pro software. Cell autofluorescence (thin line) and mPGES-1-linked fluorescence (bold line) were represented on the graphs.

**b:** PGE<sub>2</sub> was measured in the cell culture and lysate as described in material and methods. PGE<sub>2</sub> amount was normalised by the protein concentration. The graph shown is representative of 2 independent experiments.

### **Supplementary data 4: Bax-dependance of STS-induced apoptosis in GBM primary cultures.**

BdGBM cells were transfected with a plasmid encoding for Bax cDNA. Bax-transfected (+) and mock-transfected cells (-) were treated with staurosporine (STS, 150 nM, 12 h). DEVDase activity was measured in total lysate. Bax-transfected BdGBM gain an apoptotic sensitivity comparable to BeGBM sensitivity.

### **Supplementary data 4 : Schematic representation of the experiments performed in figure 6d.**

His-tagged recombinant Bax was incubated with PGE<sub>2</sub>-AChE for 1h at 30°C in BSA-saturated tubes to avoid aspecific interactions. Bax was immunoprecipitated with an antibody recognizing any conformation of the protein. The same experiment was performed with recombinant AChE not coupled to PGE<sub>2</sub>. AChE activity was measured by

Ellman's reagent addition in the immunoprecipitated pellet. Bax-PGE<sub>2</sub> associated specific AChE activity was obtained by subtracting the activity in Bax-AChE pellet to the activity in Bax-PGE<sub>2</sub>-AChE pellet.

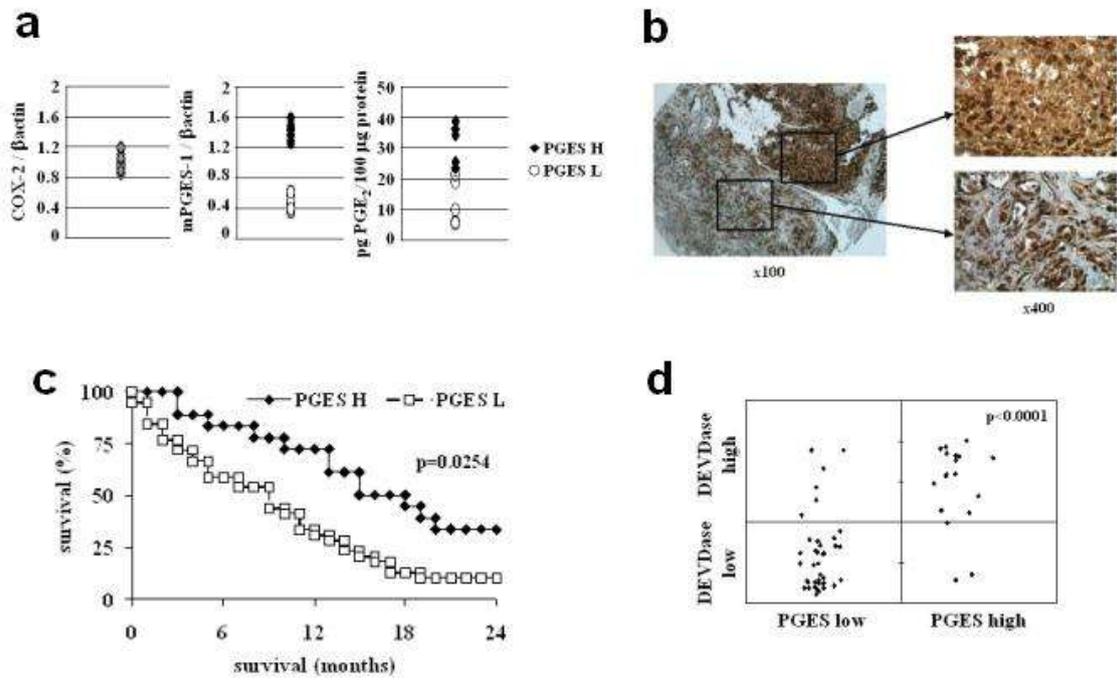


Fig.1 Lalier *et al.*

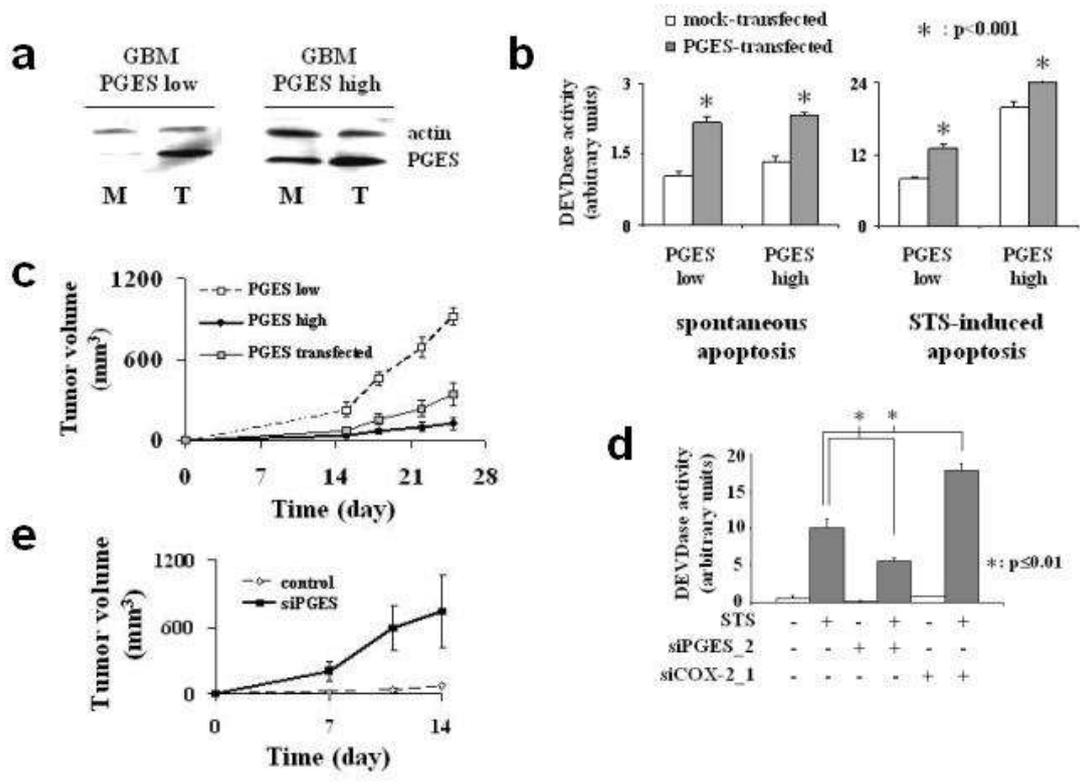


Fig.2 Lalier *et al.*

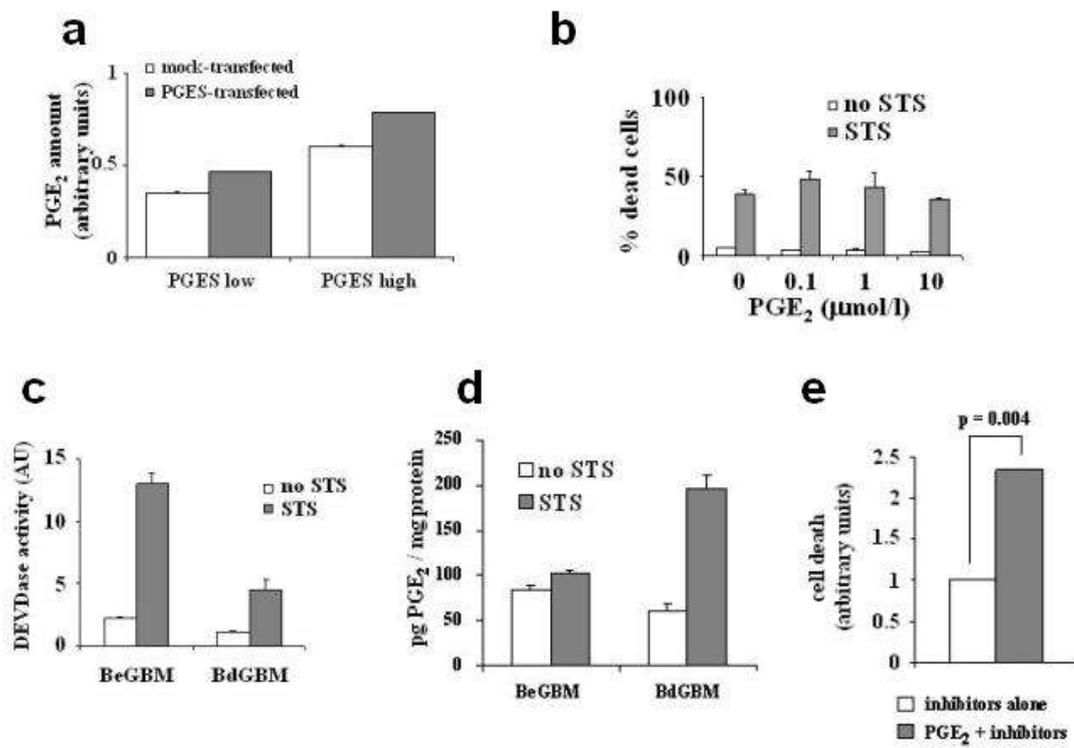


Fig.3 Lalier *et al.*

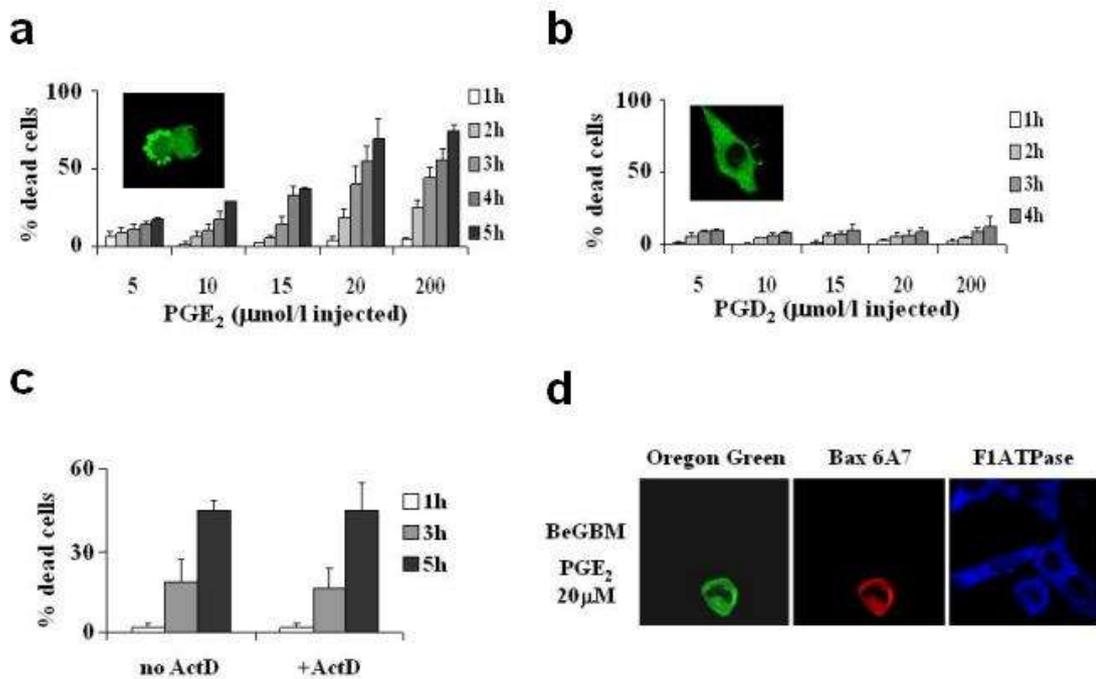


Fig.4 Lalier *et al.*

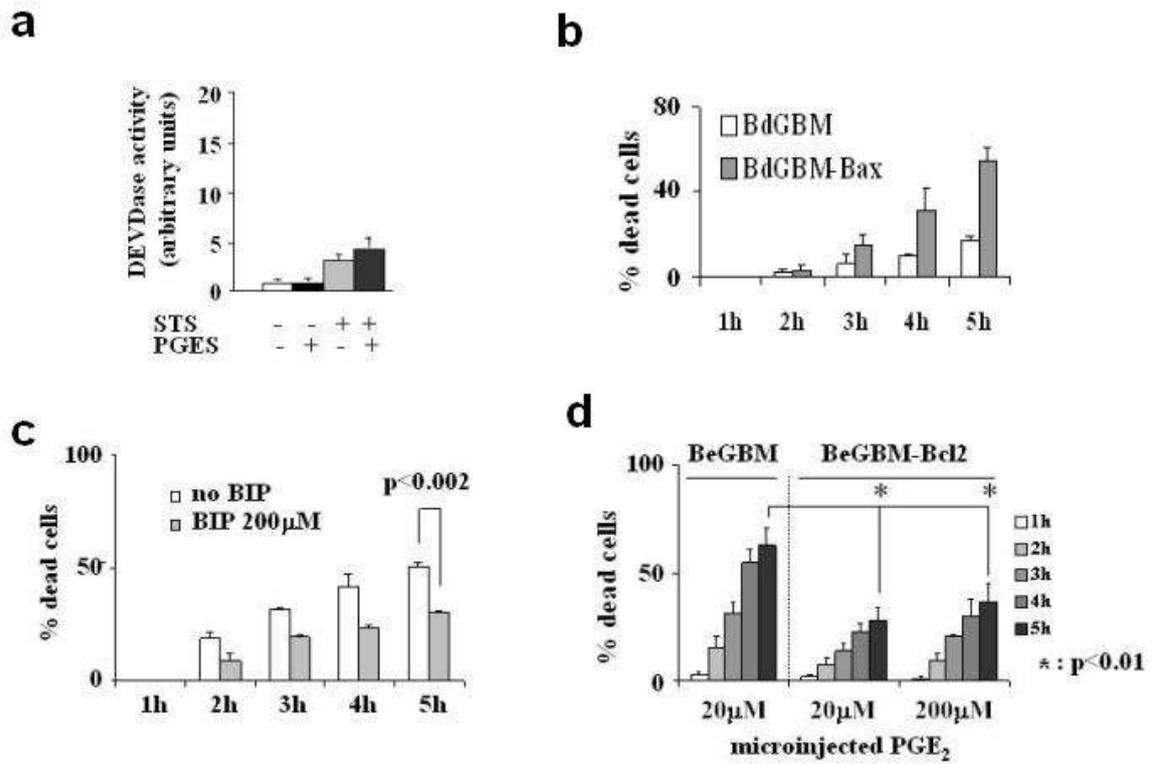


Fig.5 Lallier *et al.*

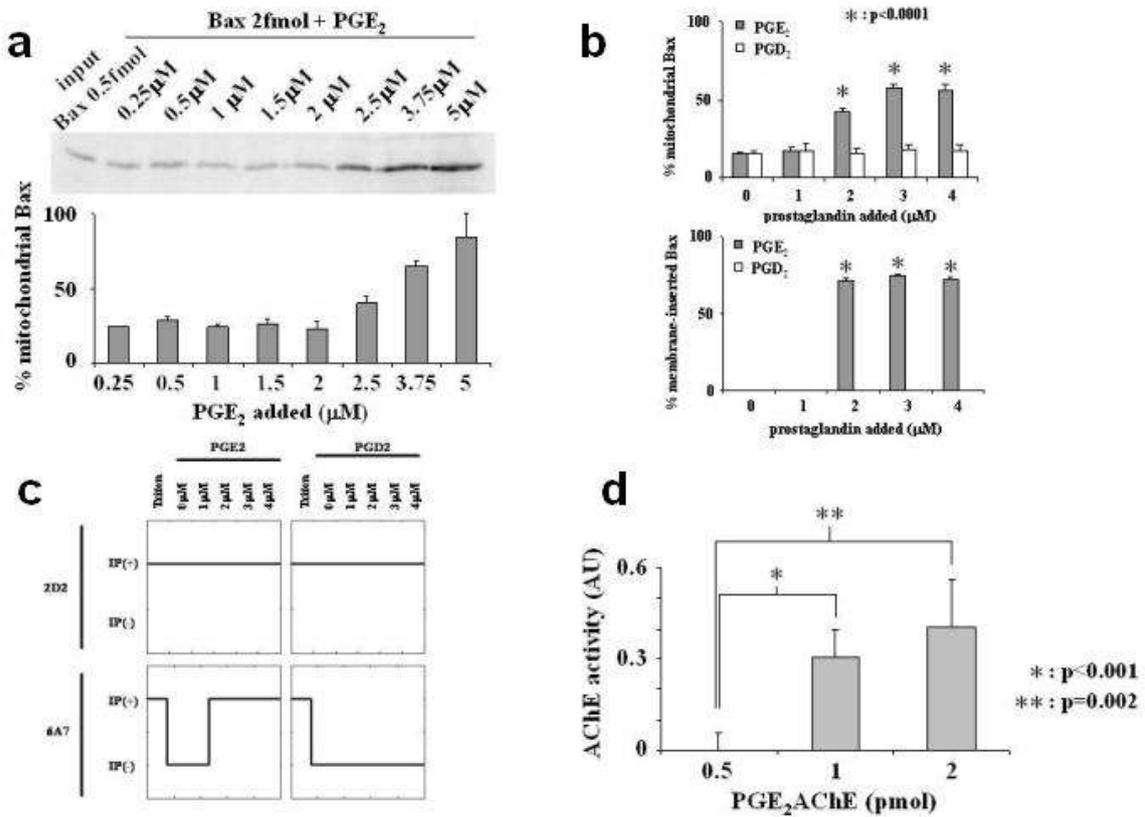


Fig.6 Lallier *et al.*

patient No	Sex	Age	Surgery	Survival (months)	Bax/Bcl2	DEVDase	mPGES-1	COX-2
1	f	59	B	6.03	1.25	6.16	0.50	0.94
2	m	71	B	1.10	1.77	1.46	0.47	0.96
3	m	80	B	1.13	0.34	1.12	0.46	1.21
4	m	49	TR	17.03	0.98	12.74	0.46	0.90
5	m	64	TR	18.10	3.70	11.46	1.26	0.96
6	m	62	TR	26.00	1.08	18.27	1.35	1.21
7	m	29	TR	89.20	0.36	18.61	0.43	1.03
8	m	49	TR	5.28	0.52	1.88	0.50	0.96
9	m	43	TR	34.49	2.80	7.84	0.41	0.91
10	m	55	B	5.59	0.25	1.84	0.38	1.07
11	m	24	TR	121.13	3.44	19.35	1.29	0.93
12	m	50	B	26.16	5.03	19.15	1.25	0.90
13	f	30	TR	2.16	3.48	1.87	0.41	1.17
14	m	63	TR	1.62	2.09	1.72	0.49	1.11
15	m	56	TR	14.00	2.01	2.88	0.46	1.00
16	f	40	B	2.10	1.30	2.21	0.57	0.88
17	m	88	B	3.00	1.47	11.19	1.44	1.00
18	m	51	TR	6.07	1.78	16.00	1.35	0.88
19	f	62	B	27.39	3.39	14.79	1.21	0.93
20	f	74	B	3.55	1.44	6.28	0.46	0.85
21	m	88	TR	16.95	1.38	17.85	1.35	0.90
22	m	62	B	1.72	1.19	2.00	0.46	0.90
23	f	64	TR	9.39	0.91	6.01	0.57	0.99
24	f	67	B	3.13	1.58	4.70	0.44	1.02
25	m	53	TR	0.30	1.79	2.40	0.47	1.05
26	m	80	B	2.03	1.62	6.10	0.50	1.01
27	f	63	TR	13.20	1.48	6.98	0.61	1.15
28	m	41	TR	6.96	NA	1.89	0.47	1.15
29	f	66	TR	13.90	2.11	6.23	1.30	1.04
30	f	86	TR	5.36	2.24	6.18	0.35	0.95
31	m	64	TR	7.13	5.23	2.98	0.46	0.95
32	m	30	B	16.53	4.07	14.26	0.49	0.94
33	f	70	TR	11.26	NA	1.11	1.30	1.00
34	m	72	B	20.10	0.91	16.17	1.37	0.94
35	m	69	TR	9.10	5.23	4.65	0.35	1.20
36	m	71	TR	4.63	3.40	6.08	0.50	1.05
37	m	61	B	11.82	3.10	7.13	0.46	0.95
38	f	19	TR	11.62	2.51	7.63	0.46	0.97
39	m	52	TR	10.00	4.62	4.65	0.47	1.00
40	m	63	TR	12.50	2.32	16.66	0.50	0.95
41	f	65	TR	19.63	1.98	16.68	1.29	0.95
42	m	50	TR	19.26	4.06	16.93	0.63	0.95
43	f	47	TR	5.36	1.56	3.46	1.46	0.87
44	m	52	B	24.20	3.02	7.09	0.59	0.94
45	m	62	TR	3.00	0.92	2.82	1.35	0.99
46	m	44	TR	17.43	2.32	10.92	0.36	1.01
47	m	73	B	16.23	3.24	2.63	0.47	1.16
48	m	55	TR	16.00	2.94	3.53	0.46	0.99
49	f	41	B	0.86	2.86	2.80	0.60	1.07
50	f	40	TR	9.23	1.90	2.85	0.61	0.96
51	f	68	TR	15.00	2.75	15.92	1.29	0.91
52	m	64	TR	4.00	3.21	5.46	0.46	0.97
53	m	46	TR	7.00	3.02	3.12	0.50	1.05
54	f	62	TR	34.16	5.65	17.63	1.59	1.01
55	m	71	B	14.00	2.81	2.76	0.46	0.99
56	m	41	TR	16.59	3.41	15.70	1.29	0.95
57	f	64	TR	13.90	3.61	20.13	1.42	1.10
58	f	69	TR	11.00	2.81	8.97	0.61	1.05
59	m	72	TR	13.49	2.92	13.24	1.50	1.06
60	m	42	TR	6.46	NA	1.63	1.30	0.99

SD 1

Group				
Clinical variables		% (nb)	survival(months)	p value
sex				
male		65% (34)	17.88	
female		35% (16)	10.93	0.2040
surgery				
total resection		68% (41)	16.98	
biopsy		32% (19)	14.49	0.3689
Molecular biomarkers				
DEVDase activity				
high		33% (20)	29.83	
low		67% (40)	8.25	0.0001
Bax/Bcl2 ratio**				
high		44% (25)	21.70	
low		56% (32)	10.98	0.0405
mPGES-1 expression**				
high		32% (18)	23.31	
low		68% (39)	12.41	0.0254

□ : high >3x normal  
low ≤ 3x normal

\*\* : Bax 0 excluded

SD 2

## **I.1 Expression de mPGES-1 dans le glioblastome multiforme**

Sur une cohorte de 60 patients, nous avons montré que 2 groupes se distinguaient sur la base de leur expression de l'enzyme mPGES-1 (Lalier et al. fig.1a). A l'inverse de l'expression de COX-2, homogène dans l'ensemble de la cohorte, l'expression de mPGES-1 est élevée chez 32% des patients. Cette surexpression est observée dans l'ensemble des cellules composant la tumeur et non dans les seules cellules endothéliales (Lalier et al. fig.1b). La survie de ces patients est presque doublée par rapport aux patients exprimant faiblement mPGES-1 (Lalier et al. fig.1c). Le niveau d'expression de mPGES-1 dans les tumeurs est corrélé positivement avec le niveau d'activité de la caspase 3 (Lalier et al. fig.1d).

De même, la surexpression, ou l'inhibition de l'expression, de mPGES-1 dans des primocultures de glioblastome, corrélée avec des niveaux de production de PGE<sub>2</sub> modifiés, induit une sensibilisation des cellules, ou une résistance respectivement, à l'apoptose spontanée et induite (Lalier et al. fig.2 et 3a). Ces différences de sensibilité à l'apoptose se traduisent par des différences de vitesses de croissance lors d'expériences de xénogreffe dans la souris nude (Lalier et al. fig.2c et e).

## **I.2 PGE<sub>2</sub> intracellulaire est pro-apoptotique par sa capacité à activer Bax**

La surexpression de mPGES-1 induit une augmentation de la concentration de PGE<sub>2</sub> dans le milieu de culture et dans le cytoplasme des primocultures de GBM (Lalier et al. fig.3a). Pourtant, les effets pro-apoptotiques de mPGES-1 ne sont pas reproduits par l'addition de PGE<sub>2</sub> dans le milieu de culture (Lalier et al. fig.3b). En revanche, une élévation de PGE<sub>2</sub> intracellulaire, par des moyens pharmacologiques ou par la microinjection, induit une apoptose Bax-dépendante, inhibée par Bcl-2 et indépendante de la transcription (Lalier et al. fig.3, 4 et 5). A l'inverse, aucune toxicité n'est observée par la microinjection de PGD<sub>2</sub> (Lalier et al. fig.4b).

L'induction de l'apoptose induite par la microinjection de PGE<sub>2</sub> a été confirmée sur d'autres lignées cellulaires, notamment la lignée Rat1 de fibroblastes de rat (**figure 14**).

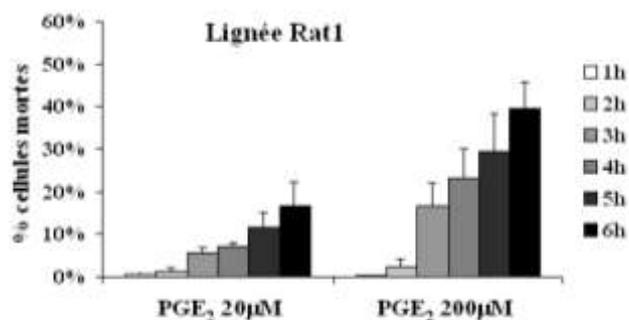


Figure 14 : mort induite par la microinjection de PGE<sub>2</sub> dans des cellules de fibroblastes Rat-1.

Dans les cellules (Lalier et al. fig.4d) et en système acellulaire (Lalier et al. fig.6a, b, c), PGE<sub>2</sub> induit l'activation de Bax, sa translocation et son insertion dans la membrane externe mitochondriale, et le relargage de protéines apoptogéniques (**figure 15**). Le relargage de ces protéines apoptogéniques peut être objectivé par la co-incubation du surnageant de mitochondries, précédemment perméabilisées avec PGE<sub>2</sub> et Bax, avec des cytosols de cellules de glioblastome non apoptotiques. La mesure de l'activité DEVDase dans ce mélange traduit la capacité du surnageant des mitochondries à activer la caspase 3.

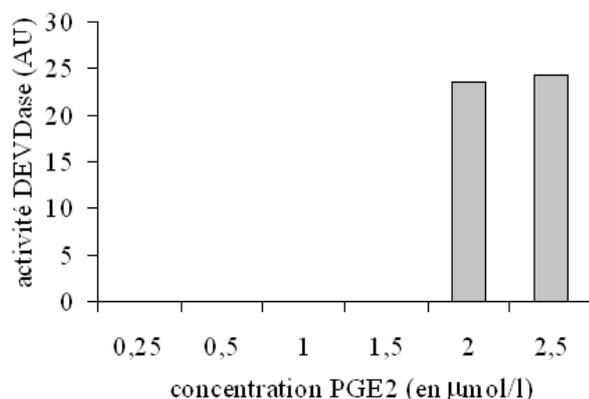


Figure 15 : relargage de protéines mitochondriales apoptogéniques par l'action conjointe de PGE<sub>2</sub> et Bax.

Ainsi, on observe que le surnageant des mitochondries incubées avec Bax seul n'est pas capable d'induire l'activation de la caspase 3 dans des cytosols. Cette capacité dépend de la concentration de PGE<sub>2</sub> co-incubée avec Bax.

Cette première étude a donc permis de montrer que la surexpression de mPGES-1 était pro-apoptotique dans le glioblastome. Cette surexpression est associée dans les primocultures

à une élévation de la production de PGE<sub>2</sub>. L'élévation de la concentration intracellulaire elle-même est capable d'induire une apoptose, dépendante de Bax, inhibée par Bcl-2 et indépendante de la transcription. En système acellulaire, PGE<sub>2</sub> induit l'activation de Bax, responsable de la perméabilisation mitochondriale.

En outre, PGE<sub>2</sub>-AChE co-immunoprécipite avec Bax recombinant, indiquant une interaction directe entre les deux molécules (Lalier et al. fig.6d).

## ***II Rôle de la balance PGE<sub>2</sub>/PGD<sub>2</sub> dans le contrôle de l'apoptose***

Dans le système nerveux central, PGD<sub>2</sub> et PGE<sub>2</sub> sont deux prostaglandines synthétisées en grande quantité. Elles sont structurellement très similaires, à l'exception d'une inversion des radicaux kéto- et hydroxy- entre les carbones C9 et C11. Elles exercent parfois des fonctions biologiques antagonistes : contrôle des cycles éveil-sommeil, de la température corporelle, de la sécrétion de LHRH (luteinizing hormone-releasing hormone)<sup>155</sup>. Dans ces exemples, PGE<sub>2</sub> joue un rôle activateur et PGD<sub>2</sub> un rôle répresseur. Nous nous sommes donc intéressés au rôle de PGD<sub>2</sub> dans l'apoptose induite par PGE<sub>2</sub>.

### **II.1 PGD<sub>2</sub> inhibe l'activation de Bax induite par PGE<sub>2</sub>**

#### **II.1.1 Microinjection**

Comme il a été décrit dans le paragraphe précédent, la microinjection de PGD<sub>2</sub> dans des primocultures de glioblastome n'induit pas d'apoptose pendant les 5 heures suivant l'injection.

Une quantité croissante de PGD<sub>2</sub> a été co-injectée avec une quantité apoptogénique de PGE<sub>2</sub> dans des primocultures de GBM comme décrit précédemment. Il est alors apparu que PGD<sub>2</sub> inhibait l'apoptose induite par PGE<sub>2</sub> (**figure 16**).

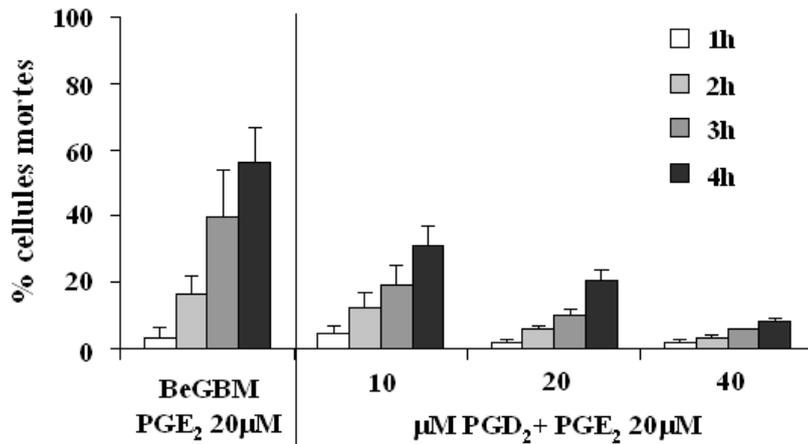


Figure 16 : PGD<sub>2</sub> protège les primocultures BeGBM de l'apoptose induite par PGE<sub>2</sub>.

Ces données ont été confirmées dans une lignée cellulaire de glioblastome, la lignée LN18. Les cellules LN18 ont été microinjectées avec PGE<sub>2</sub> ou avec une quantité équimolaire de PGE<sub>2</sub> et PGD<sub>2</sub>. Comme dans les primocultures, la microinjection de PGE<sub>2</sub> induit la mort des cellules en quelques heures (**figure 17**). Ce phénomène est inhibé par PGD<sub>2</sub> ainsi que par la surexpression de Bcl-2 dans les cellules LN18 (**figure 17**).

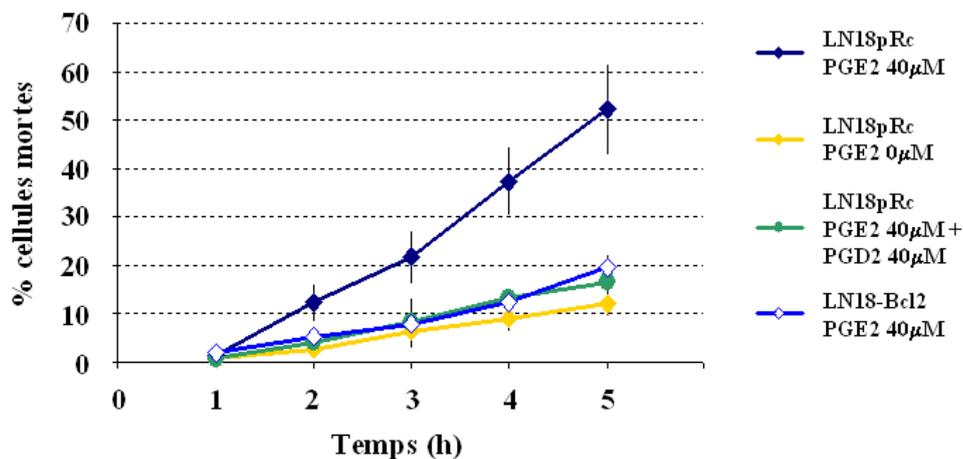


Figure 17 : microinjection de prostaglandines dans la lignée de GBM LN18.

Par ailleurs, la co-injection d'une quantité équimolaire de PGD<sub>2</sub> et de PGE<sub>2</sub> dans les primocultures de GBM abroge l'apparition de Bax activée, visualisée par immunomarquage avec un anticorps spécifique de la conformation active de Bax (6A7) (**figure 18**).

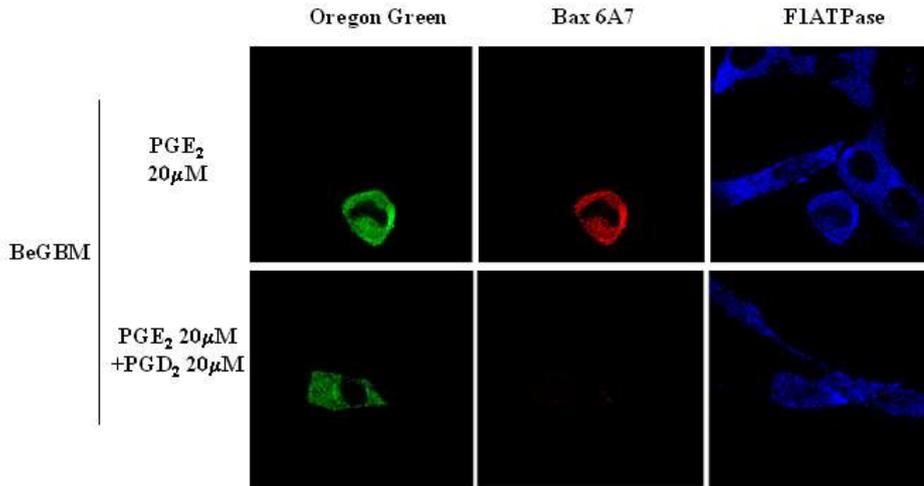


Figure 18 : PGD<sub>2</sub> abroge l'apparition de Bax en conformation active dans les cellules injectées avec PGE<sub>2</sub>.

PGD<sub>2</sub> est donc un antagoniste cellulaire de PGE<sub>2</sub> dans l'activation de Bax.

### II.1.2 Inhibition de la translocation et de l'insertion mitochondriale de Bax induites par PGE<sub>2</sub>

Nous avons précédemment montré que PGE<sub>2</sub> induisait la translocation et l'insertion de Bax dans la membrane externe mitochondriale, alors que PGD<sub>2</sub> était sans effet. Nous avons ensuite incubé Bax (traduit *in vitro*, 2fmol par expérience) avec une quantité croissante de PGD<sub>2</sub> et une dose active de PGE<sub>2</sub> (0,08nmol) en présence d'une suspension de mitochondries de foie de rat, comme décrit précédemment.

Conformément à ce que nous avons observé par le biais de la microinjection, PGD<sub>2</sub> inhibe la translocation de Bax (**figure 19**) ainsi que le relargage consécutif de cytochrome c (**figure 20**).

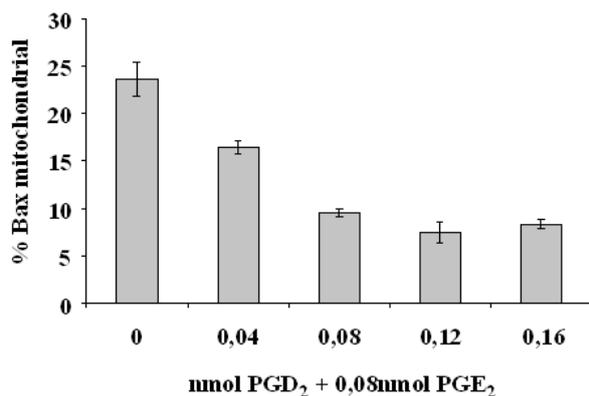


Figure 19 : effet de PGD<sub>2</sub> sur la translocation mitochondriale de Bax radiomarqué induite par PGE<sub>2</sub> en système acellulaire.

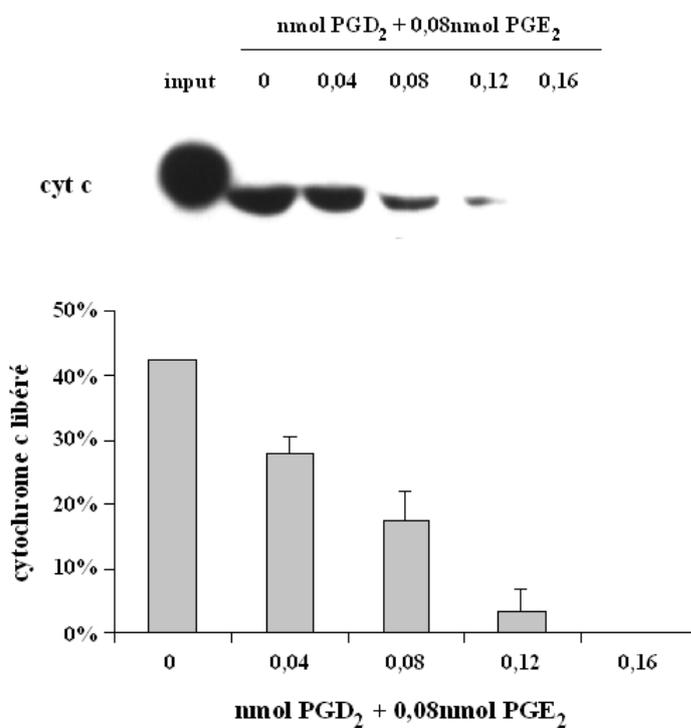


Figure 20 : effet de PGD<sub>2</sub> sur le relargage de protéines mitochondriales apoptogéniques induit par PGE<sub>2</sub> et Bax en système acellulaire.

PGD<sub>2</sub> apparaît donc comme un antagoniste de PGE<sub>2</sub> dans le contrôle de la translocation de Bax et de la perméabilisation mitochondriale associée.

### II.1.3 Inhibition du changement de conformation de Bax induit par PGE<sub>2</sub>

La translocation mitochondriale de Bax au cours de l'apoptose est un événement qui s'accompagne d'un changement de sa conformation. Des immunoprécipitations réalisées avec un anticorps spécifique de la conformation active de Bax ont précédemment révélé la capacité de PGE<sub>2</sub> à induire ce changement de conformation. Nous nous sommes donc interrogés sur l'éventuelle influence de PGD<sub>2</sub> sur ce changement de conformation. Bax traduit *in vitro*, radiomarqué (méthionine <sup>35</sup>S), a été co-incubé avec une quantité activatrice de PGE<sub>2</sub> ainsi qu'une gamme de concentration de PGD<sub>2</sub>. L'ensemble a été soumis à une immunoprécipitation par un anticorps reconnaissant toute conformation de Bax (2D2) ou spécifique de la forme activée (6A7). Les protéines de la fraction immunoprécipitée ont été séparées par SDS-PAGE. La présence de Bax dans cette fraction a été révélée par autoradiographie. Les résultats sont représentés sous forme de tableau, "+" indiquant la présence de Bax détecté dans la fraction immunoprécipitée, "-" l'absence de sa détection. Comme l'illustre le tableau ci-dessous (**figure 21**), PGD<sub>2</sub> abroge l'immunoprécipitation du Bax actif lorsqu'il atteint une quantité équimolaire à PGE<sub>2</sub>.

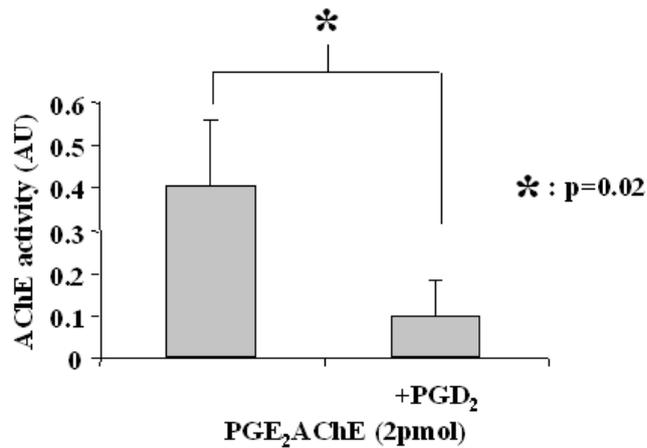
		nmol PGD <sub>2</sub> + 0,08nmol PGE <sub>2</sub>				
	Triton X100	0	0,04	0,08	0,12	0,16
2D2	+	+	+	+	+	+
6A7	+	+	+	-	-	-

**Figure 21 : mise en évidence par immuno-précipitation du changement de conformation de Bax radiomarqué induit par les prostaglandines.**

### II.1.4 Inhibition de l'interaction physique entre PGE<sub>2</sub> et Bax

Nous nous sommes enfin demandés si PGD<sub>2</sub> jouait un rôle dans la capacité de PGE<sub>2</sub> précédemment montrée à interagir avec Bax. Bax recombinant His-taggé, purifié à partir de lysat bactérien, est incubé avec PGE<sub>2</sub>-AChE comme décrit précédemment, en présence d'un excès de PGD<sub>2</sub>. Bax est ensuite immunoprécipité avec un anticorps reconnaissant toutes les conformations de Bax (2D2) et l'activité acétyl-cholinestérasique est mesurée dans la fraction immunoprécipitée par réaction colorimétrique (réactif d'Ellman). Comme le montre le

graphique (**figure 22**),  $\text{PGD}_2$  inhibe la co-immunoprécipitation de  $\text{PGE}_2\text{-AChE}$  avec Bax de façon significative.  $\text{PGD}_2$  inhibe donc l'interaction physique entre  $\text{PGE}_2\text{-AChE}$  et Bax.



**Figure 22 : co-immunoprécipitation de Bax recombinant avec  $\text{PGE}_2\text{-AChE}$ .**

Nous avons ensuite souhaité tester l'interaction de Bax avec les prostaglandines dans un système utilisant du Bax issu de cellules de Mammifères.

Des lysats cellulaires ont été réalisés à partir de primocultures de GBM, ainsi que de lignées cellulaires déficientes en Bax (DU145), transfectées ou non avec Bax. Les lysats ont été réalisés en présence d'un détergent ne modifiant pas la conformation de Bax (CHAPS)<sup>20</sup>. Les lysats ont ensuite été incubés en plaque 96 puits coatée avec un anticorps monoclonal dirigé contre l'extrémité N-terminale de Bax. Après lavage, les prostaglandines sont incubées sur le Bax fixé dans les puits, en présence de traces de  $\text{PGE}_2\text{-AChE}$  ajouté comme traceur. Après des lavages extensifs, l'activité acétyl-cholinestérasique est mesurée dans les puits par réaction colorimétrique (réactif d'Ellman). La spécificité de l'activité AChE mesurée dans les puits est vérifiée, d'une part en testant la fixation de  $\text{PGE}_2\text{-AChE}$  dans des puits incubés avec du lysat de cellules Bax-déficientes, d'autre part en vérifiant l'absence de fixation d'acétyl-choline recombinante dans les puits incubés avec du lysat contenant Bax ou non (non montré). Comme il est représenté dans la **figure 23**,  $\text{PGE}_2$  se lie spécifiquement à Bax et cette liaison est inhibée par  $\text{PGD}_2$ .

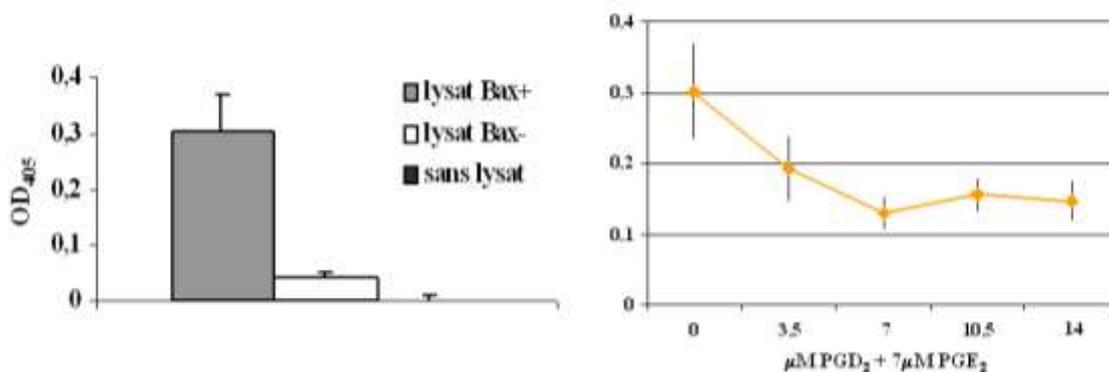


Figure 23 : mise en évidence de l'interaction PGE<sub>2</sub>/Bax par EIA, inhibée par PGD<sub>2</sub>.

Ainsi, PGD<sub>2</sub> inhibe l'interaction entre PGE<sub>2</sub> et Bax, l'activation de Bax induite par PGE<sub>2</sub>, sa translocation mitochondriale et l'apoptose des cellules exprimant Bax induite par PGE<sub>2</sub>.

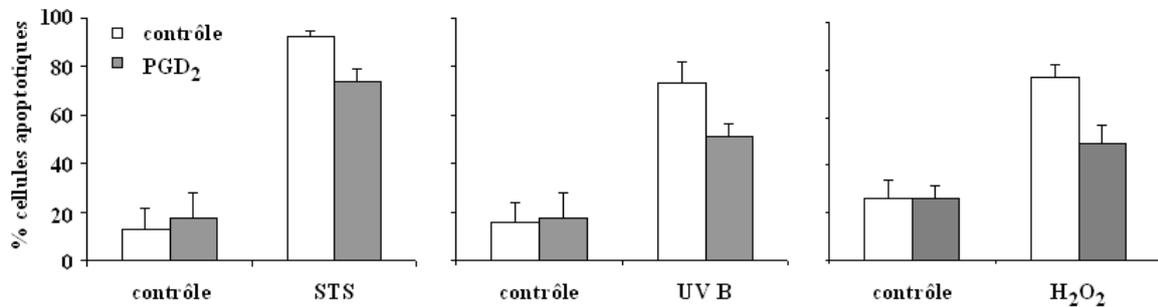
## II.2 PGD<sub>2</sub> inhibe la mort cellulaire induite par certains autres inducteurs

Nous avons ensuite testé la capacité inhibitrice de PGD<sub>2</sub> à inhiber l'apoptose induite par d'autres stimuli apoptotiques que la microinjection de PGE<sub>2</sub>. Des primocultures de GBM ont ainsi été microinjectées avec PGD<sub>2</sub> (20 μM). L'actinomycine D a été rajoutée dans le milieu de culture afin de shunter la voie de signalisation impliquant la fixation du métabolite final de PGD<sub>2</sub> (15d-Δ<sup>12-14</sup>PGJ<sub>2</sub>) aux récepteurs nucléaires PPARγ. Après comptage des cellules microinjectées viables, les cellules ont été traitées pendant la durée adéquate avec différents inducteurs d'apoptose.

### II.2.1 Inducteurs de mort sensibles à PGD<sub>2</sub>

Dans les conditions décrites ci-dessus, les cellules ont été traitées par 3 stimuli agissant sur des cibles différentes : un inhibiteur de kinases (straurosporine, 150nM, 12h), un facteur endommageant l'ADN (UV B, 30sec exposition, comptage après 18h) et un stress

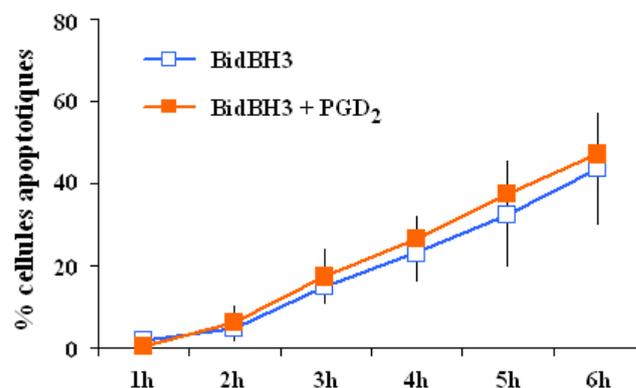
oxydant ( $H_2O_2$  1mM 6h). Comme le montrent les graphes ci-dessous,  $PGD_2$  protège les cellules de façon significative mais partielle (20 à 35%) contre ces 3 stimuli (**figure 24**).



**Figure 24 : effet protecteur de  $PGD_2$  microinjecté préalablement à différents traitements d'induction d'apoptose.**

### II.2.2 Apoptose indépendante de $PGD_2$

Les protéines à BH3-seul interviennent dans la médiation de l'activation de Bax. Notamment, il a été montré que l'apoptose médiée par tBid pouvait être mimée par la microinjection d'un peptide représentant son domaine BH3<sup>17</sup>. Nous avons donc réalisé une co-injection de  $PGD_2$  avec le peptide BidBH3 (100nM). Aucun effet protecteur de  $PGD_2$  n'a été observé vis-à-vis de la mort induite par BidBH3, même à des concentrations très élevées de  $PGD_2$  (150 $\mu$ M) (**figure 25**).



**Figure 25 : effet de  $PGD_2$  sur l'apoptose induite par la microinjection d'un peptide BH3.**

PGD<sub>2</sub> semble donc capable de protéger partiellement les primocultures de GBM exprimant Bax contre l'apoptose induite par certains inducteurs. En revanche, il n'interfère pas avec l'apoptose induite par la microinjection de BidBH3.

### II.2.3 Dosage de PGE<sub>2</sub> après traitement à la staurosporine

L'apoptose induite par la staurosporine est partiellement inhibée par PGD<sub>2</sub>. Etant donné l'effet antagoniste de PGD<sub>2</sub> vis-à-vis de l'activité pro-apoptotique de PGE<sub>2</sub> intracellulaire, nous nous sommes demandé si PGE<sub>2</sub> pourrait intervenir dans le déclenchement de l'apoptose induite par la staurosporine. Nous avons donc réalisé un dosage de PGE<sub>2</sub> intracellulaire sur des primocultures de GBM exprimant Bax (BeGBM) ou non (BdGBM) avant et après traitement par la staurosporine à une dose sub-létale (80 nM 16h). Comme le montre le graphique ci-dessous, le traitement à la staurosporine accroît PGE<sub>2</sub> intracellulaire. Il n'est donc pas exclu que l'élévation intracellulaire de PGE<sub>2</sub> soit un facteur participant à la toxicité de la staurosporine. Il est à noter par ailleurs que cet accroissement est plus marqué dans les BdGBM, pour lesquelles PGE<sub>2</sub> n'est pas toxique (**figure 26**).

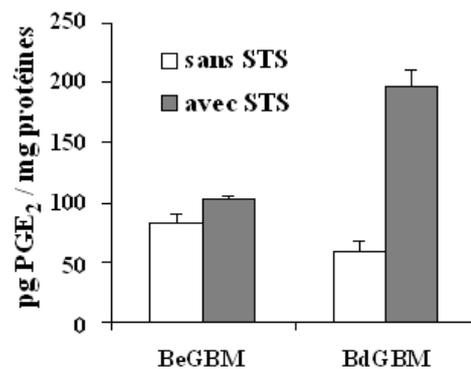


Figure 26 : dosages de PGE<sub>2</sub> dans des primocultures de GBM traitées à la staurosporine.

## II.2.4 Rôle de la balance des enzymes mPGES-1 et L-PGDS

Dans le glioblastome, mPGES-1 et L-PGDS sont les deux enzymes majoritaires qui agissent en aval de COX-2 pour produire respectivement PGE<sub>2</sub> et PGD<sub>2</sub>. L'expression des 3 enzymes COX-2, mPGES-1 et L-PGDS a été inhibée par la transfection de plasmides codant pour des shRNA dirigés spécifiquement contre ces enzymes dans des primocultures de GBM. Après sélection, la sensibilité des cellules à la staurosporine a été mesurée par la mesure de l'activité DEVDase dans des lysats protéiques totaux. L'effet de l'inhibition de l'expression de mPGES-1 a été illustré précédemment (cf I.1). Comme le montre le graphe ci-dessous, à l'inverse de ce qui avait été observé pour mPGES-1, l'inhibition de l'expression de COX-2 ou celle de L-PGDS induit une sensibilité accrue des cellules à l'apoptose induite par la staurosporine (**figure 27**).

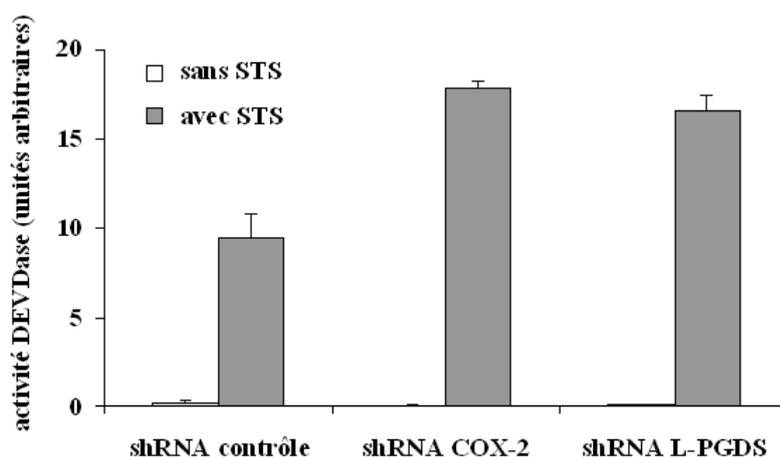
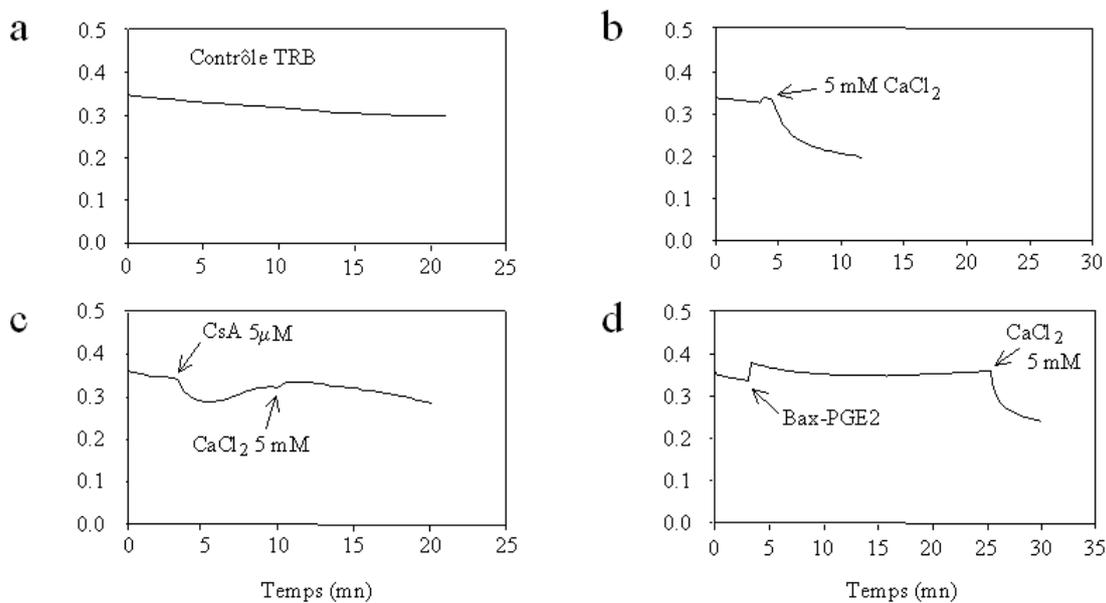


Figure 27 : effet des shRNA dirigés contre COX-2 et L-PGDS dans la sensibilité des GBM à l'apoptose.

## III Bases moléculaires de l'activation de Bax par PGE<sub>2</sub>

### III.1 La perméabilisation mitochondriale induite par PGE<sub>2</sub> et Bax n'implique pas l'ouverture du PTP

L'un des mécanismes proposés pour la perméabilisation mitochondriale est l'ouverture du PTP, responsable d'un gonflement mitochondrial et de la rupture de la membrane mitochondriale externe. L'ouverture du PTP entraîne un gonflement des mitochondries, mesuré par la diminution de la densité optique de la suspension mitochondriale. Les expériences sont réalisées à partir d'une suspension de mitochondries de foie de rat dans un tampon d'association (**figure 28, a**). Comme le montre la figure ci-dessous, le chlorure de calcium induit une ouverture du PTP (**b**), inhibé par la cyclosporine A (**c**). A l'inverse, l'addition de Bax traduit in vitro pré-incubé avec PGE<sub>2</sub> à une concentration induisant son activation ne provoque pas l'ouverture du PTP, visualisée en fin d'expérience par l'ajout de CaCl<sub>2</sub> (**d**).

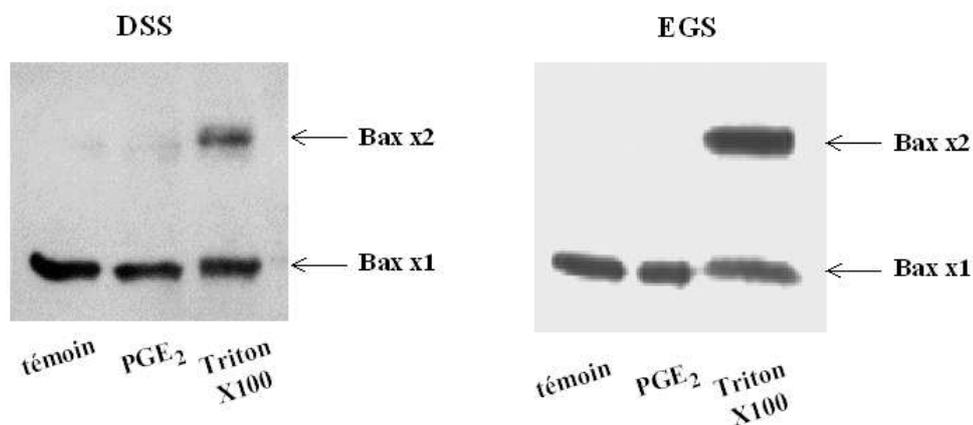


**Figure 28 : mesure du gonflement mitochondrial en présence de prostaglandines et de Bax.**

La perméabilisation mitochondriale induite par l'action coordonnée de PGE<sub>2</sub> et Bax n'est donc pas liée à un gonflement mitochondrial et est indépendante du pore de perméabilité transitoire (PTP).

### III.2 PGE<sub>2</sub> n'induit pas la dimérisation de Bax en l'absence de la membrane mitochondriale

Des expériences de cross-linking ont été réalisées à partir de lysat cellulaire réalisé en présence de CHAPS incubé avec PGE<sub>2</sub> pendant 1h à 30°C. Le Triton X100 a été utilisé comme contrôle positif de l'induction de la dimérisation. Après incubation, les extraits ont été traités avec un agent pontant (DSS ou EGS), puis révélés par Western-blot avec un anticorps dirigé contre Bax (**figure 29**).



**Figure 29** : crosslinking sur des lysats cellulaires traités par PGE<sub>2</sub>.

Lorsque le lysat cellulaire est incubé avec du tritonX100, du Bax est détecté à un poids apparent voisin de 40kD, ce qui est compatible avec un dimère de Bax. En revanche, ce complexe de Bax à 40kD n'est pas observé dans le lysat incubé avec PGE<sub>2</sub>.

Le même type d'expérience a été réalisé avec du Bax recombinant de souris (ProteinXLab), délété de ses hélices  $\alpha 1$  et  $\alpha 9$  (**figure 30**). De façon cohérente avec ce qui a été observé dans le lysat cellulaire, on observe une dimérisation du Bax recombinant en présence de TritonX100 mais pas de PGE<sub>2</sub>, indiquant par ailleurs que les hélice  $\alpha 1$  et  $\alpha 9$  de Bax ne sont pas nécessaires à sa dimérisation.

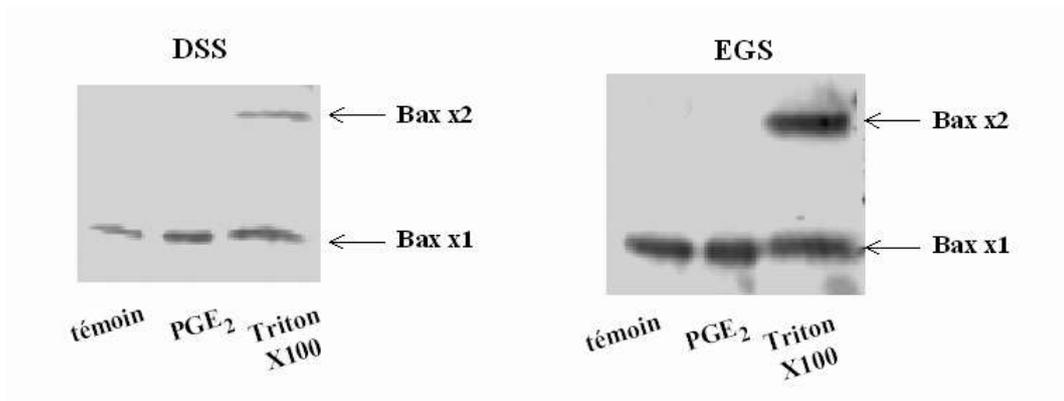


Figure 30 : crosslinking sur du Bax recombinant tronqué des hélices  $\alpha 1$  et  $\alpha 9$ .

PGE<sub>2</sub> n'induit donc pas de d'oligomérisation de Bax en solution.

### III.3 PGE<sub>2</sub> induit une modification de la structure de Bax

Comme il a été décrit précédemment, la partie N-terminale de l'hélice  $\alpha 1$  de Bax, reconnue par l'anticorps 6A7, est exposée suite à l'incubation avec PGE<sub>2</sub> (cf figure paragraphe II.1.3). Cette exposition dévoile la séquence d'adressage de Bax responsable de sa translocation à la membrane externe de la mitochondrie.

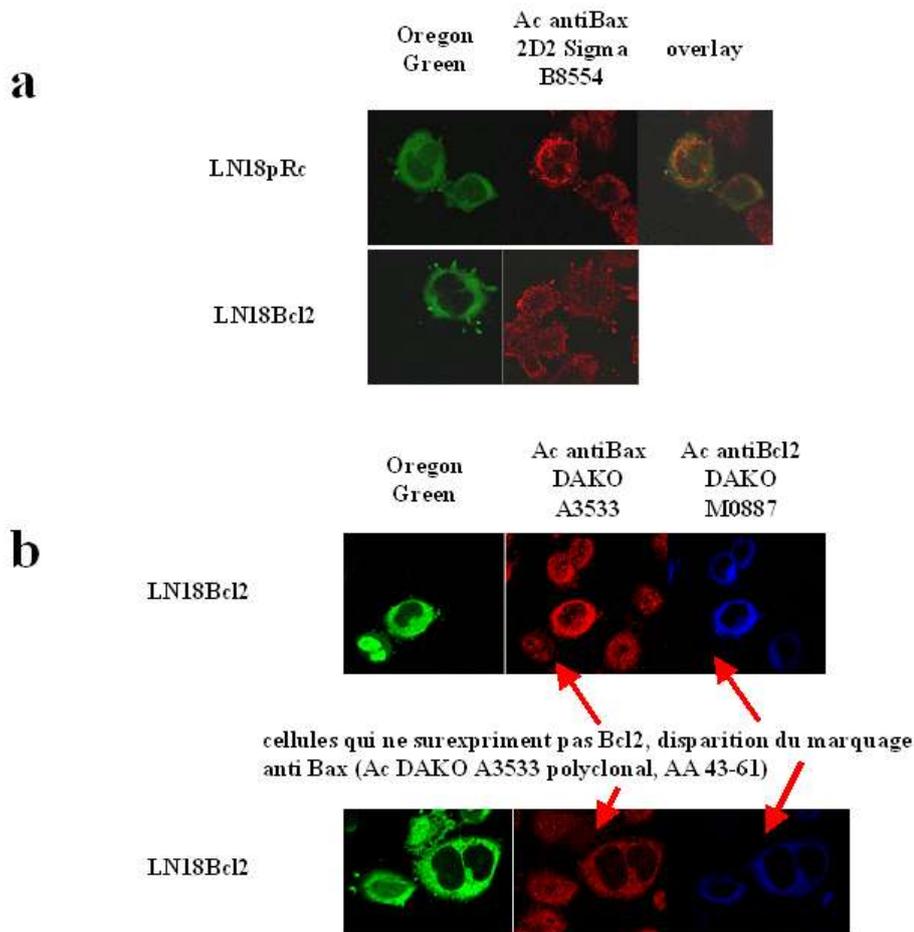
Le changement de conformation a été également observé dans la lignée cellulaire de glioblastome LN18. Ces cellules, qui expriment naturellement très faiblement Bcl-2, ont été transfectées avec un plasmide codant pour le cDNA de Bcl-2. Les cellules contrôles ont été transfectées avec le plasmide vide (pRcCMV). Ces cellules ont été micro-injectées avec PGE<sub>2</sub>, la sonde fluorescente (Oregon Green) permettant de visualiser les cellules injectées. Trois heures après injection, les cellules ont été fixées, perméabilisées puis marquées avec différents anticorps dirigés contre Bax ou Bcl-2

L'anticorps 2D2 reconnaît les conformations native et active de Bax. Dans les cellules micro-injectées avec PGE<sub>2</sub>, Bax adopte une distribution punctiforme, compatible avec une localisation mitochondriale (**figure 31, a**). La surexpression de Bcl-2 inhibe ce changement de localisation.

Par ailleurs, un anticorps polyclonal dirigé contre les résidus 43-61 de Bax, soit le domaine BH3 de Bax, a été utilisé sur des cellules LN18-Bcl-2 microinjectées avec PGE<sub>2</sub> (**figure 31, b**). La microinjection de PGE<sub>2</sub> induit une disparition du marquage anti-Bax dans les cellules

exprimant faiblement Bcl-2, alors que ce marquage révèle une distribution cytosolique de Bax dans les cellules non microinjectées ou exprimant fortement Bcl-2 (**figure 31, b**).

Ces observations indiquent donc que PGE<sub>2</sub> induit dans les cellules un changement de la conformation de Bax, associé à son changement de distribution cellulaire et à la mort des cellules.



**Figure 31 : immunofluorescence sur des cellules LN18 microinjectées par PGE<sub>2</sub>.**

Ainsi, la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale induite par Bax, activé par PGE<sub>2</sub>, n'implique pas l'ouverture du PTP. En outre, l'activation de Bax par PGE<sub>2</sub> n'induit pas sa dimérisation en solution. En revanche, PGE<sub>2</sub> induit bien un changement de conformation de Bax, objectivé par l'exposition de l'épitope reconnu par l'anticorps 6A7, en système cellulaire et acellulaire, et par l'inaccessibilité de l'épitope 43-61.

## IV Bases moléculaires de l'interaction entre PGE<sub>2</sub> et Bax

### IV.1 Epitopes de Bax impliqués dans l'interaction

Les régions de Bax impliquées dans la liaison de PGE<sub>2</sub> ont été étudiées par la technique de l'"epitope mapping". La séquence de Bax a été décomposée en une série de peptides de 12 acides aminés, chaque peptide répétant les 10 derniers acides aminés du précédent. Ces peptides ont été fixés de façon ordonnée à l'aide d'un automate sur une membrane de cellulose, par l'intermédiaire d'un linker de 8 à 10 motifs d'éthylène glycol de façon ordonnée. Après démasquage des peptides fixés, la membrane a été saturée par de la BSA5%. La membrane a ensuite été incubée avec du PGE<sub>2</sub>-biotinimide pendant une nuit à 4°C sous agitation. Après lavages, la membrane a été incubée à nouveau en présence de streptavidine couplée à une peroxydase. La fixation a été révélée par électrochimiluminescence et détectée sur film radiographique. Le signal a ensuite été quantifié en triplicate par informatique et représenté sous la forme du graphe ci-dessous. La valeur de l'intensité de fixation attribuée à chacun des acides aminés de la séquence de Bax représente la moyenne des intensités de fixation de la prostaglandine sur les différents peptides dans lesquels il se trouve. La position des différentes hélices de Bax est indiquée par les barres horizontales au-dessus de l'histogramme (**figure 32**).

Comme l'indique le graphique, PGE<sub>2</sub> se fixe majoritairement au niveau des 3 hélices les plus hydrophobes de Bax, H $\alpha$ 1, H $\alpha$ 5 et H $\alpha$ 9.

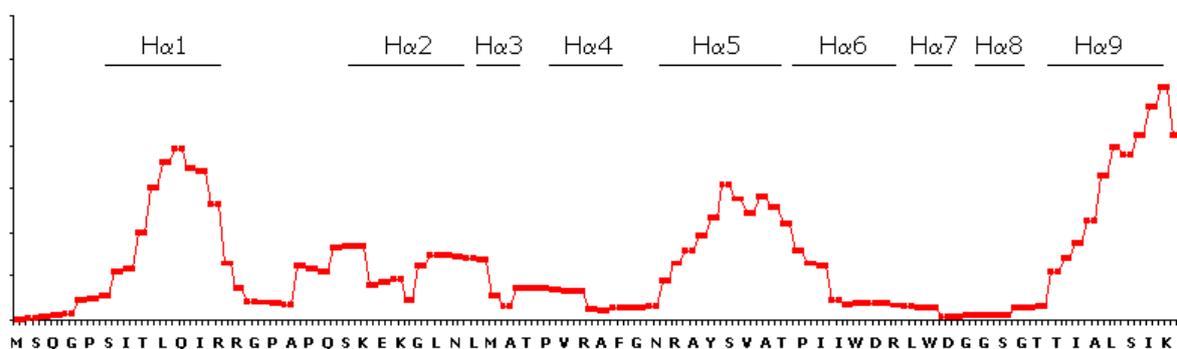
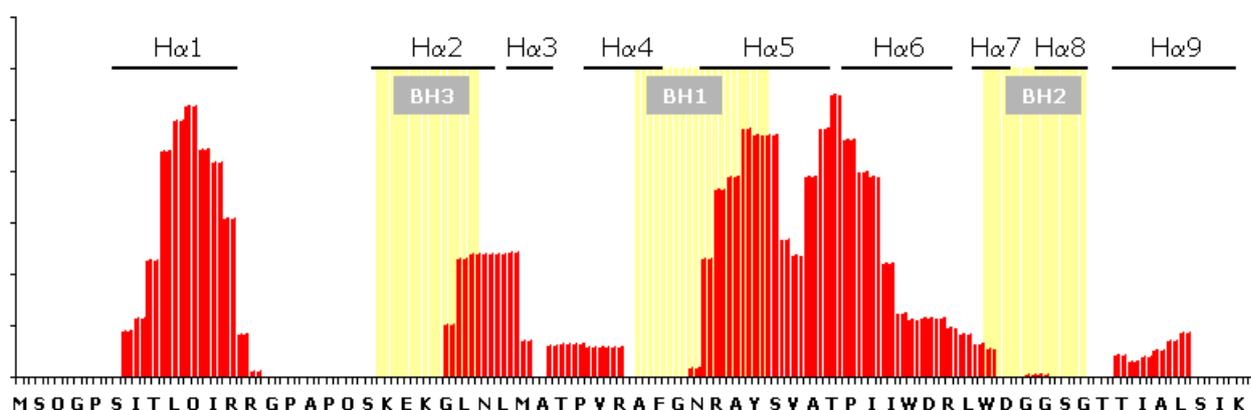


Figure 32 : sites potentiels d'interaction entre PGE<sub>2</sub> et Bax, étudiés par epitope mapping.

Lors de la déshybridation de la membrane, il est apparu que PGE<sub>2</sub> restait fixée de façon plus ou moins intense selon les peptides, même en présence après traitement par un solvant (méthanol). Notamment, la fixation de PGE<sub>2</sub> sur les peptides couvrant l'hélice  $\alpha 5$  et la partie N-terminale de l'H $\alpha 6$  semble irréversible. L'intensité de fixation de PGE<sub>2</sub> sur la membrane a donc été pondérée pour chaque acide aminé par le taux de fixation résiduel de PGE<sub>2</sub> après déshybridation. Ceci permet de déterminer les zones d'interaction maximale entre PGE<sub>2</sub> et Bax, en terme d'intensité et d'avidité de liaison. Ces données sont représentées sur le graphe ci-dessous (**figure 33**).



**Figure 33 : représentation des interactions potentielles entre PGE<sub>2</sub> et Bax, pondérées par la force de l'interaction.**

Il a ainsi été déterminé 3 zones prédictives d'interaction maximale entre PGE<sub>2</sub> et Bax : l'hélice  $\alpha 1$ , l'extrémité C-terminale du domaine BH1 et la jonction des hélices  $\alpha 5$ - $\alpha 6$ . En représentant la position de ces 3 zones dans la structure tertiaire de Bax (en jaune sur la **figure 34**), on s'aperçoit que les zones de l'hélice  $\alpha 1$  et du BH1 interagissant avec PGE<sub>2</sub> sont des régions très proches et susceptibles d'établir entre elles des liaisons hydrophobes. En revanche, elles paraissent peu accessibles dans la conformation inactive de Bax. A l'inverse, la jonction  $\alpha 5$ - $\alpha 6$  semble facilement accessible à un partenaire d'interaction.

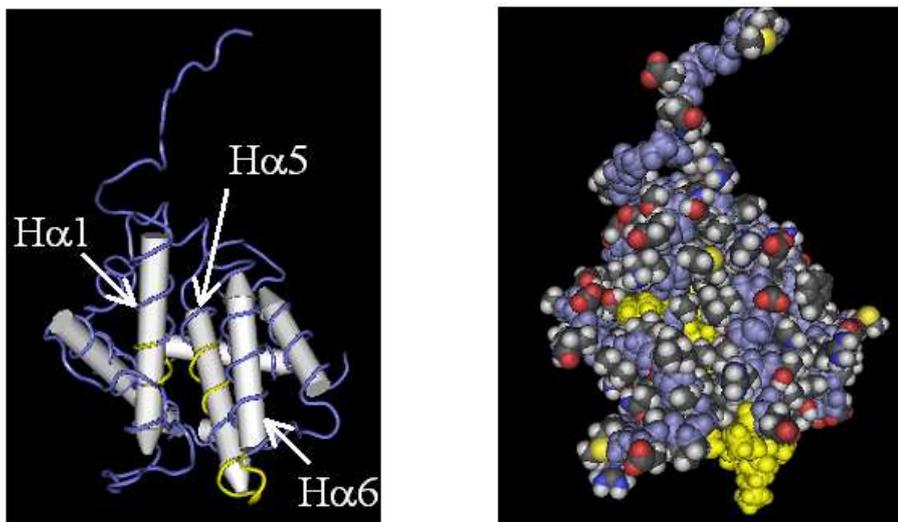


Figure 34 : localisation des sites potentiels d'interaction maximale entre PGE<sub>2</sub> et Bax dans la structure 3D.

L'hybridation de la membrane avec PGE<sub>2</sub>-biotinimide a ensuite été renouvelée, en présence cette fois d'un excès de PGD<sub>2</sub>. La quantification du signal a été réalisée comme précédemment, l'acquisition des 2 images étant faite simultanément pour éviter le biais dû à une différence d'exposition. On observe que PGD<sub>2</sub> inhibe effectivement l'hybridation de PGE<sub>2</sub> sur la membrane au niveau des hélices α1 et α9. En revanche, l'hybridation résiduelle de PGE<sub>2</sub> sur de nombreux peptides empêche une interprétation du signal mesuré sur l'ensemble de la séquence.

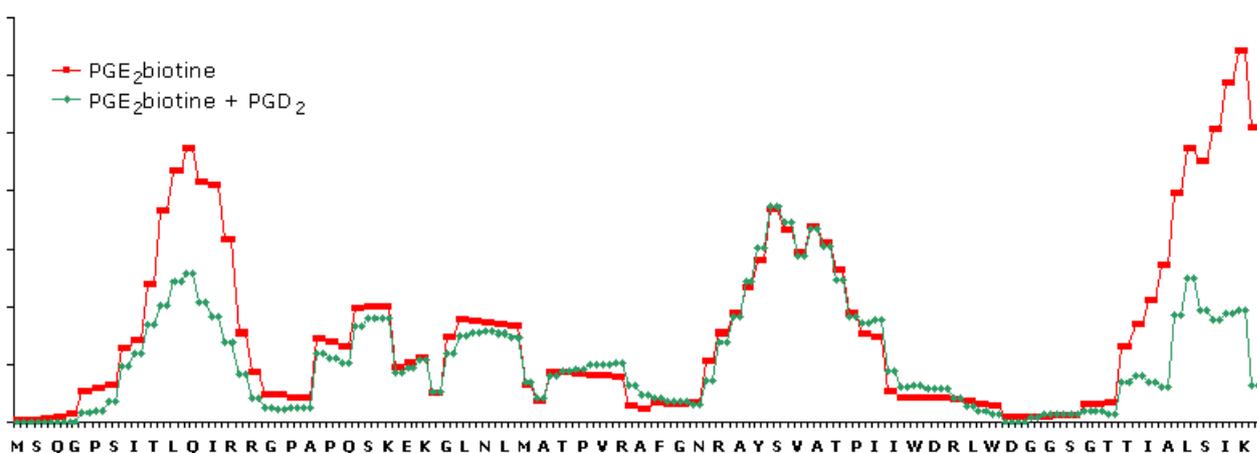


Figure 35 : représentation des sites de disruption de l'interaction PGE<sub>2</sub>/Bax induite par PGD<sub>2</sub>.

## IV.2 Rôle de l'hélice $\alpha 9$ dans l'interaction PGE<sub>2</sub>-Bax

### IV.2.1 Sensibilité des cellules exprimant Bax $\Delta C$ à PGE<sub>2</sub>

Une lignée cellulaire déficiente en Bax (DU145) a été transfectée de façon stable avec un plasmide codant pour le cDNA de Bax délété de son hélice  $\alpha 9$  (Bax $\Delta C$ ). Après sélection, les cellules ont été micro-injectées avec PGE<sub>2</sub>. Le nombre de cellules présentant des caractéristiques morphologiques de cellules apoptotiques est compté chaque heure suivant la microinjection (figure 36).

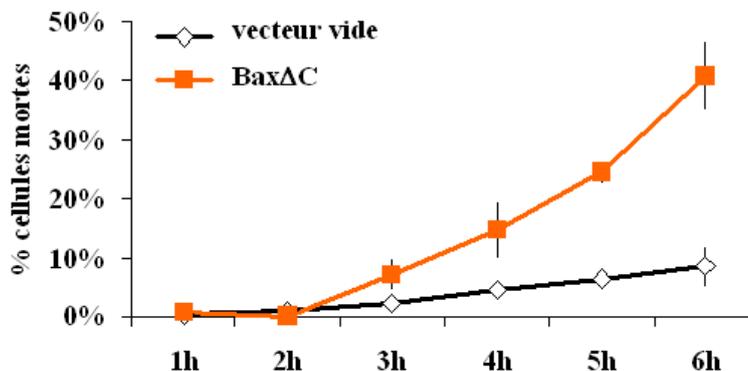


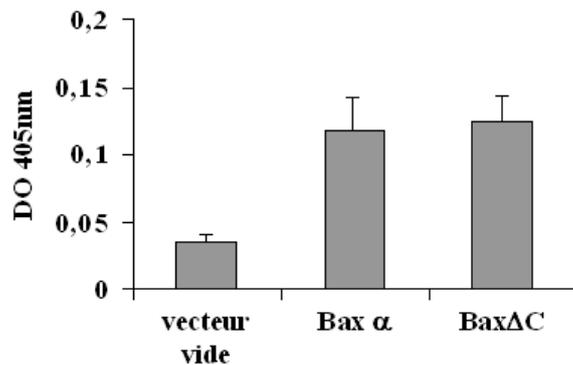
Figure 36 : microinjection de PGE<sub>2</sub> dans des cellules exprimant Bax $\Delta C$  de manière exogène.

La délétion de l'hélice  $\alpha 9$  de Bax n'abroge donc pas la capacité de PGE<sub>2</sub> à induire l'apoptose de façon Bax-dépendante.

### IV.2.2 Rôle de l'hélice $\alpha 9$ dans l'interaction physique

Des lysats protéiques ont été réalisés à partir de cellules DU145 transfectées avec Bax délété de l'hélice  $\alpha 9$  (Bax $\Delta C$ ) ou Bax  $\alpha$  en tampon CHAPS. Le contrôle négatif consiste en du lysat de cellules transfectées avec le vecteur vide. Comme il a été décrit dans le paragraphe II.1.4, la liaison PGE<sub>2</sub>-AChE-Bax a été mesurée en plaque et révélée par réaction colorimétrique (réactif d'Ellman).

Les expériences ont été réalisées en conditions saturantes pour Bax, en raison de la disparité des niveaux d'expression de la protéine d'intérêt entre les cellules DU-Bax  $\alpha$  et DU-Bax $\Delta C$ , et répétées au minimum 3 fois. La densité optique mesurée a été corrigée par la densité optique mesurée en l'absence de lysat protéique (**figure 37**).



**Figure 37 : rôle de l'hélice  $\alpha 9$  dans l'interaction PGE<sub>2</sub>/Bax.**

La délétion de l'hélice  $\alpha 9$  de Bax n'altère donc pas la capacité de liaison de PGE<sub>2</sub>-AChE à Bax.

### **IV.3 Rôle des cystéines de Bax dans l'interaction**

Il a été montré que le 15d- $\Delta^{12-14}$ PGJ<sub>2</sub>, prostaglandine dérivée de PGD<sub>2</sub>, pouvait former des liaisons covalentes avec des cystéines libres portées par ses protéines cibles<sup>124,156,157</sup>. Nous nous sommes donc penchés sur le rôle joué par les cystéines de Bax dans la régulation de son activité par les prostaglandines.

#### **IV.3.1 Sensibilité des cellules exprimant les mutants de Bax à PGE<sub>2</sub>**

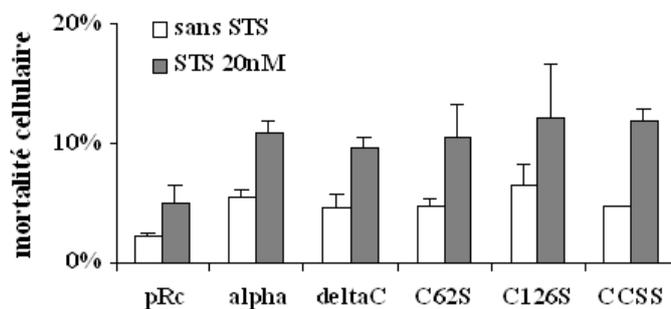
##### **IV.3.1.1 Mutagenèse de Bax**

La séquence de Bax compte 2 cystéines, en positions 62 et 126. Ces cystéines ont été mutées en sérines par mutagenèse dirigée, en utilisant le kit GeneTailor (Invitrogen).

La mutagenèse a été réalisée par PCR à partir d'une matrice méthylée. Des bactéries ont ensuite été transformées avec le produit de PCR obtenu et cultivées en milieu sélectif. L'efficacité de la mutagenèse a été vérifiée par séquençage des plasmides purifiés.

Des cellules déficientes en Bax (DU145) ont été transfectées avec ces mutants et sélectionnées. La capacité des mutants à médier l'apoptose a été vérifiée en mesurant la mort cellulaire induite par un traitement par la staurosporine.

Comme le montre la figure ci-dessous (**figure 38**), les mutants de Bax conservent une capacité à sensibiliser les cellules à l'apoptose, malgré un niveau d'expression faible.



**Figure 38 : sensibilité à l'apoptose des cellules exprimant les mutants de Bax.**

La mutation des cystéines de Bax n'abroge donc pas sa capacité à médier l'apoptose dans ces cellules.

#### ***IV.3.1.2 Microinjection de PGE<sub>2</sub>***

Les cellules DU145 exprimant les mutants de Bax ont ensuite été microinjectées avec PGE<sub>2</sub>. De façon très claire, il apparaît que le mutant C62S de Bax est sensible à la microinjection de PGE<sub>2</sub>, alors que le mutant C126S ne l'est pas (**figure 39**).

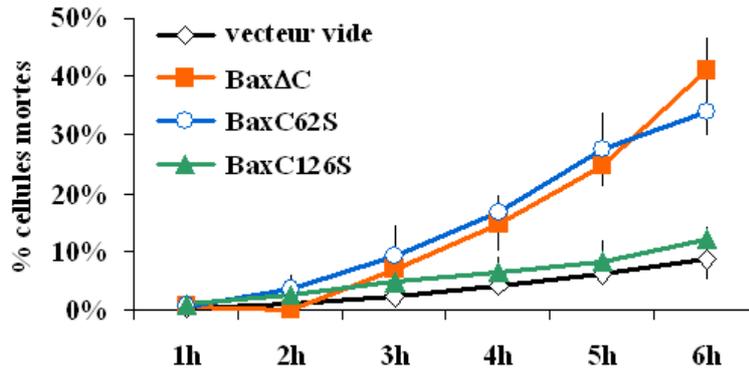


Figure 39 : sensibilité des mutants de Bax à la microinjection de PGE<sub>2</sub>.

#### IV.3.2 Rôle des cystéines dans l'interaction physique

L'interaction physique de PGE<sub>2</sub> avec les mutants de Bax a été investiguée par la technique d'immunoessai en plaque décrite plus haut. Des lysats protéiques de cellules exprimant les mutants ont été incubés sur les plaques. PGE<sub>2</sub>-AChE a ensuite été mis en contact du Bax fixé et l'activité acétyl-cholinestérasique a été mesurée dans les puits par la technique d'Ellman.

Sur l'ensemble des expériences réalisées, aucune différence significative dans la fixation de PGE<sub>2</sub>-AChE n'a été observée entre le Bax natif et ses mutants.

## Discussion

### ***mPGES-1 et glioblastome multiforme.***

La surexpression de mPGES-1 est associée à un pronostic défavorable dans différents types de cancers <sup>139,141,146,158</sup>. Cependant, il apparaît clairement dans la cohorte de patients sur laquelle nous avons travaillé que la surexpression de mPGES-1 dans le glioblastome multiforme est corrélée à une survie prolongée. Dans cette cohorte, une très forte corrélation positive existe entre l'expression de mPGES-1 et l'activité apoptotique spontanée dans les tumeurs. La question de la nature des cellules responsables de cette surexpression globale dans la tumeur s'est donc posée. Nous avons observé que dans le GBM, toutes les cellules tumorales, y compris les cellules cancéreuses gliales elles-mêmes, surexprimaient mPGES-1. La mise en culture de ces cellules de glioblastome n'a pas altéré leur niveau d'expression de mPGES-1, indiquant que celle-ci n'était pas à imputer à la sécrétion de cytokines, par exemple pro-inflammatoires, par les cellules stromales de la tumeur. Les travaux de Blaine et al. <sup>159</sup> sur des souris transgéniques surexprimant spécifiquement mPGES-1 dans les cellules de l'épithélium pulmonaire ont soulevé un point intéressant. Ils ont en effet montré que, bien que l'induction chimique de tumeurs pulmonaires coïncide avec une induction de l'expression de mPGES-1 et de COX-2, une expression constitutive élevée de mPGES-1 n'accroît ni l'incidence ni la sévérité des lésions observées. Dans notre système, la surexpression de mPGES-1 dans les primocultures de glioblastome est suffisante pour accroître les niveaux d'apoptose spontanée et induite, et pour diminuer le potentiel tumorigénique des cellules en xénogreffe. A l'inverse, une inhibition de l'expression de mPGES-1 dans les primocultures accroît leur résistance à l'apoptose et leur potentiel tumorigénique.

De façon intéressante, nous avons observé que l'inhibition de l'expression des enzymes COX-2 et L-PGDS dans les primocultures de GBM sensibilisait ces cellules à l'apoptose. Ces deux enzymes semblent donc jouer un rôle opposé à celui de mPGES-1 dans la régulation de l'apoptose. Ce résultat suggère ainsi l'existence d'une nouvelle voie de régulation de la sensibilité des cellules à l'apoptose, reposant sur un double équilibre : l'équilibre COX-2 / mPGES-1, enzymes fonctionnant en série, et l'équilibre L-PGDS / mPGES-1, enzymes fonctionnant en parallèle.

Nous mettons donc en évidence une distorsion importante entre les données de la littérature rapportant la surexpression de mPGES-1 dans diverses tumeurs solides et nos données cliniques et expérimentales dans le GBM. Dans le système nerveux central, COX-2 est exprimée de façon constitutive, ce qui confère à ce tissu une particularité dans la régulation de la synthèse des prostaglandines. En revanche, il a été rapporté que les gliomes surexprimaient COX-2, d'autant plus qu'ils sont de grade élevé. Les tumeurs de grade IV que sont les GBM expriment fortement COX-2. Nous avons observé que cette expression était homogène dans l'ensemble de la cohorte de patients de notre étude. Cette expression massive, par la quantité correspondante de PGH<sub>2</sub> potentiellement produite, pourrait expliquer notre observation selon laquelle mPGES-1 est l'enzyme limitante dans la production de PGE<sub>2</sub> dans le GBM.

Il est à noter que le gène codant pour mPGES-1 est le gène *pig12*, identifié en 1997 par Polyak et al. comme l'un des gènes induits par la surexpression *in vitro* de p53. p53 lui-même est un facteur de transcription dont la fonction est équivoque et dépendante du contexte cellulaire dans lequel il se trouve. Ainsi, p53 est à la fois un facteur responsable de l'activation du processus apoptotique, notamment par la transcription de protéines telles que Puma et Noxa, et un facteur de survie, activant les processus de réparation de l'ADN.

Une étude récente <sup>160</sup> a montré que la surexpression de mPGES-1 dans une lignée de GBM (U87-MG) stimulait la prolifération par une voie EP2/4 dépendante. Lors des expériences que nous avons réalisées sur des primocultures ou des lignées de GBM, aucune accélération de la prolifération n'a été observée lors de traitement par PGE<sub>2</sub> extracellulaire. En revanche, nous avons observé que la surexpression de mPGES-1 induite par transfection dans des cellules conduisait, à long terme, à la production de cellules totalement résistantes à PGE<sub>2</sub>, proliférant très rapidement et surexprimant Bcl-2. Ce résultat suggère que l'exportation rapide de PGE<sub>2</sub> est sélectionnée au fil des passages. La concentration extracellulaire accrue de PGE<sub>2</sub> pourrait alors expliquer les phénomènes de prolifération observés. Par ailleurs, les tests préliminaires réalisés sur la lignée U87-MG nous ont révélé que, bien que sensibles, ces cellules répondaient faiblement à la microinjection de PGE<sub>2</sub>, raison pour laquelle nous avons mené l'essentiel de nos expériences sur une autre lignée de GBM (LN18). L'explication la plus évidente à ce résultat serait que les U87-MG exporteraient spontanément efficacement PGE<sub>2</sub>. Cette hypothèse va dans le sens de l'observation faite par Prayner et al. <sup>160</sup> selon laquelle la surexpression de mPGES-1 dans la lignée U87-MG serait suivie d'effets essentiellement liés à la signalisation membranaire de PGE<sub>2</sub>.

## ***PGE<sub>2</sub> et cancer***

Les effets promoteurs de PGE<sub>2</sub> dans la tumorigenèse sont rapportés comme étant liés à la liaison de PGE<sub>2</sub> sur ses récepteurs membranaires, essentiellement EP2 et EP4. Cette fixation induit la production d'AMPC, qui aboutit à l'activation du facteur de transcription CREB et à l'inhibition des MAP kinases et des facteurs de transcription c-Jun et JunB<sup>124</sup>. L'activation de la voie de signalisation liée au récepteur EP2 peut également mettre en jeu la voie  $\beta$ -caténine dans les cellules cancéreuses coliques<sup>161</sup>. Une transactivation du récepteur à l'EGF a également été observée dans des cellules cancéreuses coliques suite à la fixation de PGE<sub>2</sub> sur ses récepteurs EP4<sup>153</sup>. Une autre voie de signalisation démontrée de PGE<sub>2</sub> est celle du récepteur PPAR $\delta$  : dans le cancer colo-rectal, la liaison de PGE<sub>2</sub> au récepteur PPAR $\delta$  induit une résistance à l'apoptose<sup>151</sup>.

Dans les primocultures de GBM sur lesquelles nous avons travaillé, nous avons montré que les effets pro-apoptotiques de PGE<sub>2</sub> observés n'étaient liés à aucune de ces voies de signalisation. En premier lieu, nous avons établi que le traitement des cellules par PGE<sub>2</sub> extracellulaire n'induisait ni apoptose, ni sensibilisation à l'apoptose. Ce résultat exclut la participation des récepteurs membranaires dans l'apoptose induite par PGE<sub>2</sub>. Nous avons ensuite montré que l'apoptose induite par PGE<sub>2</sub> n'était pas inhibée par l'actinomycine D, i.e qu'elle était indépendante de la transcription. La voie de signalisation à laquelle nous nous intéressons est donc différente de celles déjà décrites, qui impliquent des récepteurs membranaires ou nucléaires. La mort cellulaire induite par PGE<sub>2</sub> est dépendante de Bax et inhibée par Bcl-2. Nous avons pu observer en système acellulaire que PGE<sub>2</sub> interagissait avec Bax et qu'il induisait sa transition conformationnelle, responsable de la translocation et de l'insertion de Bax dans la membrane externe mitochondriale. La voie pro-apoptotique de PGE<sub>2</sub> est donc une voie très directe : c'est un activateur direct de la protéine Bax, protéine régulant directement la perméabilisation mitochondriale durant l'apoptose.

Ce mécanisme que nous décrivons est une nouvelle voie de signalisation de PGE<sub>2</sub>. Ce mécanisme est également important du point de vue de la régulation de l'activation de Bax, puisque nous décrivons PGE<sub>2</sub> comme le premier composé organique non peptidique capable d'induire directement le changement de conformation de Bax.

Nous mettons ainsi en évidence un rôle fondamentalement bipolaire de PGE<sub>2</sub>. En effet, de nombreux travaux viennent à l'appui de son rôle anti-apoptotique et permettent l'identification des récepteurs et des voies de signalisation impliquées. A l'inverse, le travail

présenté ici établit que PGE<sub>2</sub> peut induire la mort des cellules cancéreuses lorsqu'il s'accumule dans le cytosol. Quelle est la signification biologique de cette observation?

Evan et Vousden <sup>162</sup> décrivent l'évolution de la tumeur comme une succession d'altérations génétiques, dont la sélection permet aux cellules tumorales de s'adapter à un environnement progressivement défavorable. En effet, au fur et à mesure de la croissance de la tumeur, les cellules se heurtent à l'éloignement par rapport à la vascularisation sanguine existante (entraînant un déficit en oxygène et en nutriments), au confinement et à la réponse immunitaire de l'hôte. L'apparition d'une surexpression de mPGES-1 dans une fraction de la population implique pour la survie de ces cellules qu'elles développent des mécanismes de résistance. Dans le cas de mPGES-1, cette résistance peut consister en une surexpression conjointe d'une enzyme de dégradation de PGE<sub>2</sub>, un déficit dans la voie apoptotique (perte d'expression de Bax, surexpression de Bcl-2 ou d'un inhibiteur de caspases), ou du développement d'un mécanisme efficace d'exportation de PGE<sub>2</sub>. Cette dernière solution constitue non seulement une voie de sauvegarde pour la cellule surexprimant mPGES-1, mais également un avantage pour l'ensemble de la tumeur. En effet, la sécrétion de PGE<sub>2</sub> permet l'apparition d'une néovascularisation, par l'intermédiaire de la production de VEGF et de l'accroissement du potentiel migratoire des cellules endothéliales. La réponse immunitaire est également réorientée vers une réponse de type Th2, facilitant ainsi l'échappement de la tumeur au système immunitaire. La stimulation des cellules cancéreuses elles-mêmes par une quantité importante de PGE<sub>2</sub> dans le milieu facilite également leur migration, remédiant ainsi au confinement des cellules. Enfin, la stimulation autocrine et paracrine de PGE<sub>2</sub> induit la surexpression de Bcl-2, ce qui favorise à la fois la survie de la cellule productrice et la sélection positive de la surexpression de mPGES-1. En d'autres termes, même si la survenue de cette surexpression aboutit à la mort de la cellule productrice, la production transitoire de PGE<sub>2</sub> peut participer à constituer dans les autres cellules un terrain favorable à la sélection de modifications génétiques ultérieures. Ainsi, la population tumorale dans son ensemble se charge progressivement en facteurs de résistance. Cette spirale dans l'adaptation est cependant à double tranchant. En effet, la sélection positive de facteurs de résistance relâche la pression de sélection négative de ce qu'on pourrait appeler des "points de fragilité". Ainsi, il a été observé dans les gliomes que les niveaux d'expression de Bax et de Bcl-2 évoluaient de façon parallèle en fonction du grade de la tumeur. La question reste entière de savoir quel événement, de la surexpression de Bax ou de celle de Bcl-2, est à l'origine de l'autre, si tel est le cas. Quoi qu'il en soit, cette situation ouvre la voie à des perspectives de développements

thérapeutiques. Le développement de stratégies contournant les mécanismes de résistance permettrait alors d'utiliser contre les cellules leurs propres caractéristiques.

Cependant, nous avons observé un élément en défaveur de cette hypothèse dans le glioblastome. En effet, parmi la cohorte de patients de notre étude, une faible proportion (3%) présentait des GBM déficients en Bax. Or cette déficience en Bax des tumeurs n'est pas apparue corrélée à une surexpression de mPGES-1. A l'inverse, une corrélation a été établie entre la surexpression de mPGES-1 et l'expression du variant Bax  $\Psi$  dans les GBM. Ce variant de Bax, tronqué dans sa région N-terminale, est lui-même fortement apoptogénique et a une localisation constitutivement mitochondriale. La présence de cette forme de Bax insérée dans la membrane mitochondriale, dans des cellules de GBM qui forment malgré tout des tumeurs évolutives et mortelles, suggère que ces cellules ont développé un mécanisme de résistance en aval de la perméabilisation mitochondriale. Selon cette hypothèse, la surexpression de mPGES-1 dans ces cellules prend un sens.

## ***AINS et cancer***

Le rôle de PGE<sub>2</sub> dans les processus de transformation cancéreuse et de progression tumorale a longtemps été considéré comme équivalent au rôle de la surexpression de COX-2, lui-même souvent confondu avec l'efficacité des AINS en traitement préventif ou adjuvant en cancérologie. Deux remarques importantes sont nécessaires à ce propos. Tout d'abord, il est réducteur de considérer que la mesure extracellulaire de PGE<sub>2</sub> est le reflet de l'activité de COX-2. La sécrétion de PGE<sub>2</sub> est la résultante de différents paramètres, dont le premier est l'activité des différentes enzymes de synthèse, intervenant en parallèle ou en série, et parfois en concurrence avec d'autres enzymes utilisant le même substrat (notamment L-PGDS). Interviennent ensuite les enzymes responsables du catabolisme de PGE<sub>2</sub>. Bien qu'aucune activité 15-PGDH n'ait été mesurée dans le cerveau adulte, dans le glioblastome, aucune donnée n'est disponible sur l'existence d'une activité catabolique in situ. Enfin, la sécrétion de PGE<sub>2</sub> dépend de l'activité des différents transporteurs membranaires (PGT, MOAT, MRP4).

Le deuxième point à prendre en compte concernant l'efficacité des AINS, plus particulièrement des inhibiteurs de COX-2, en cancérologie est l'existence d'effets indépendants de l'inhibition de l'enzyme. Le premier volet de ces effets collatéraux des inhibiteurs de COX-2 est dépendant de PGE<sub>2</sub>. Il a ainsi été montré que certains AINS étaient également des inhibiteurs de mPGES-1 ou de la 15-PGDH, à des niveaux variables selon les

molécules. L'effet d'un inhibiteur sur la production nette de PGE<sub>2</sub> est donc la résultante des inhibitions relatives des différentes enzymes. D'autre part, il a également été montré que certains AINS inhibaient l'activité de MRP4, responsable au moins en partie de l'exportation extracytoplasmique de PGE<sub>2</sub>. Dans l'absolu, une simple inhibition de l'exportation cellulaire de PGE<sub>2</sub> pourrait donc être interprétée comme une inhibition de sa synthèse, alors qu'elle résulterait en fait en une élévation de la concentration intracellulaire de PGE<sub>2</sub>.

Par ailleurs, des effets anti-prolifératifs d'un inhibiteur spécifique de COX-2 (NS-398) ont également été observés dans un modèle COX-2-déficient. De la même façon, certains effets des inhibiteurs de COX-2 ne sont pas antagonisés par l'ajout de PGE<sub>2</sub><sup>163</sup>. Il existe donc une part de l'activité des AINS qui échappe aux mécanismes pour lesquels ils ont été synthétisés et utilisés.

Pour toutes ces raisons, il est difficile à l'heure actuelle de faire des prédictions concernant l'efficacité des inhibiteurs de COX-2 en oncologie. Des études pré-cliniques et cliniques aux résultats discordants ou paradoxaux ont d'ailleurs été publiées<sup>164</sup>. Les taxanes induisent la mort des cellules cancéreuses, tout en induisant une augmentation de la transcription de COX-2 et une stabilisation de son ARN<sup>164</sup>. Les inhibiteurs de COX ont donc été envisagés comme agents thérapeutiques adjuvants aux taxanes. Ainsi, dans une lignée de carcinome mammaire (MCF-7), le docetaxel exerce un effet synergique avec un inhibiteur de COX-2, d'autant plus que les cellules expriment fortement Her-2. A l'inverse, une étude sur l'importance du protocole d'administration des drogues dans un modèle de carcinome ovarien a montré que l'administration d'un inhibiteur de COX-2 (NS-398) associée à un traitement par les taxanes diminuait l'efficacité du traitement, à moins d'administrer le NS-398 dans un deuxième temps. Ces données pharmacologiques, ainsi que les effets COX-indépendants des AINS, invitent à la plus grande prudence en terme d'utilisation systématique en traitement adjuvant.

L'autre élément invitant à une utilisation prudente des AINS est le constat que certaines de ces molécules sont de très bons inhibiteurs des pompes exportatrices de PGE<sub>2</sub>. Notamment, l'indométhacine et le kétoprofène sont à faible dose de très efficaces inhibiteurs de MRP4<sup>120</sup>. Ainsi, plus que de l'inhibition de la synthèse de PGE<sub>2</sub>, la diminution de PGE<sub>2</sub> circulant pourrait être un effet dû à la séquestration de PGE<sub>2</sub> à l'intérieur des cellules. En oncologie, ces inhibiteurs à cibles multiples pourraient donc cumuler les bénéfices : ils inhibent l'activation des voies favorisant l'expansion tumorale en abaissant la concentration de PGE<sub>2</sub> circulant, réduisent les phénomènes inflammatoires et douloureux fréquemment associés au développement de tumeurs, et participent à l'induction de la mort des cellules

cancéreuses en augmentant la concentration intracellulaire de PGE<sub>2</sub>. En revanche, dans le cadre des maladies neuro-dégénératives, dans lesquelles les AINS sont fréquemment prescrits, afin de diminuer la réaction inflammatoire locale participant au développement des lésions nerveuses, cette observation peut appeler à de plus amples investigations. Il serait notamment important de vérifier l'éventuelle sensibilité des neurones à l'apoptose régulée par PGE<sub>2</sub> intracellulaire, ainsi que l'effet d'AINS tels que le kétoprofène sur la concentration intracellulaire de PGE<sub>2</sub> dans les neurones. Cette remarque est d'ailleurs applicable à d'autres types de cellules. Le mécanisme décrit ici pourrait rendre compte notamment de la toxicité des AINS observée sur les cardiomyocytes.

### ***PGE<sub>2</sub> et activation de Bax***

Nous avons montré que PGE<sub>2</sub> induisait une mort Bax-dépendante dans les primocultures de glioblastome, et dans d'autres cellules. Par une simplification progressive du système d'étude, nous avons établi que PGE<sub>2</sub> induisait un changement de conformation de Bax, responsable de sa translocation mitochondriale et de la perméabilisation de la membrane externe de celle-ci, et que ce phénomène était lié à une interaction physique entre PGE<sub>2</sub> et Bax.

La nature de cette liaison ainsi que les résidus impliqués pour les deux molécules ne sont pas encore déterminés. PGE<sub>2</sub> semble s'associer spontanément avec les hélices hydrophobes de Bax ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 5$  et  $\alpha 9$ ). En revanche, le type d'interaction entre PGE<sub>2</sub> et les peptides décrivant ces régions n'est visiblement pas identique pour ces trois hélices.

L'interaction entre PGE<sub>2</sub> et l'hélice  $\alpha 9$  de Bax est facilement rompue par une déshybridation classique. Ceci suggère que la nature de cette interaction puisse être de nature électrostatique et/ou hydrophobe de faible intensité. Il est d'ailleurs à noter qu'une autre prostaglandine, PGD<sub>2</sub>, est capable d'inhiber l'interaction PGE<sub>2</sub> /hélice  $\alpha 9$ , indiquant que cette liaison est spécifique non pas de PGE<sub>2</sub> mais d'une petite molécule hydrophobe de structure comparable à PGE<sub>2</sub>. La délétion de l'hélice  $\alpha 9$  de Bax n'altère ni la capacité de liaison de PGE<sub>2</sub> à Bax, ni la capacité de PGE<sub>2</sub> à induire la mort des cellules de façon Bax-dépendante, comme le montre la sensibilité des cellules DU145-Bax $\Delta C$  à la microinjection de PGE<sub>2</sub>.

L'interaction entre PGE<sub>2</sub> et l'hélice  $\alpha 1$  de Bax est inhibée par PGD<sub>2</sub> et rompue par un lavage par un solvant des prostaglandines (méthanol). En revanche, elle est peu disruptée par

une déshybridation classique (glycine 0,2M - Tween20 0,05% - pH 2,5). Ces données évoquent une liaison forte de type hydrophobe. Il est remarquable que la zone d'interaction maximale dans l'hélice  $\alpha 1$  soit un tetrapeptide particulièrement hydrophobe ( $L^{25}L^{26}L^{27}Q^{28}$ ). Sur le plan fonctionnel, il a été montré dans notre équipe que la substitution de la leucine 26 par une glycine prévenait totalement la localisation mitochondriale de Bax. Cet effet a été mis en relation avec une déstructuration de l'hélice  $\alpha$  induite par cette mutation. Il n'est cependant pas exclu que le rôle de cette leucine implique un autre mécanisme que le maintien de la structure en hélice de la région. De façon intéressante, on remarque que cette zone d'interaction maximale de  $PGE_2$  avec l'hélice  $\alpha 1$  se trouve dans la structure 3D de Bax en regard de la zone d'interaction maximale de  $PGE_2$  avec l'H  $\alpha 5$ , elle aussi fortement hydrophobe ( $L^{113}FYFAS^{118}$ ). Ces deux régions forment donc un petit foyer fortement hydrophobe avec lequel les prostaglandines peuvent interagir. Cependant, ce foyer est apparemment inaccessible dans la conformation native de Bax. La liaison d'une protaglandine dans ce site nécessiterait donc un relâchement de la structure de Bax. Par ailleurs, seul  $PGE_2$  est capable d'activer Bax. L'introduction d'un petit composé hydrophobe entre les hélices  $\alpha 1$  et  $\alpha 5$  pourrait assouplir la structure de Bax en désolidarisant les hélices les unes des autres, libérant l'hélice  $\alpha 1$ , portant la séquence d'adressage à la mitochondrie, ainsi que l'hélice  $\alpha 5$ , faisant partie de la séquence d'insertion de Bax dans la membrane. Cependant, ce modèle de changement de conformation ne rend pas compte des effets opposés joués par  $PGD_2$  et  $PGE_2$ .

L'interaction entre  $PGE_2$  et la jonction entre les hélices  $\alpha 5$  et  $\alpha 6$  de Bax apparaît comme la troisième zone d'interaction maximale entre  $PGE_2$  et Bax. Elle est apparue irréversible lors des traitements effectués, c'est-à-dire particulièrement forte. Les travaux de plusieurs équipes ont établi qu'une autre prostaglandine, la  $15d\Delta^{12-14}PGJ_2$ , dérivée de  $PGD_2$ , était capable de former des liaisons covalentes avec les cystéines de différentes protéines (cJun, PPAR $\gamma$ , Ras). La zone de jonction H $\alpha 5$ - $\alpha 6$  fixant fortement  $PGE_2$  contient une cystéine (C126). La mutation de cette cystéine abroge la mort induite par  $PGE_2$  et Bax, alors qu'elle n'inhibe pas leur interaction et qu'elle ne supprime pas la capacité du mutant à induire la mort. En outre, l'addition de N-acétylcystéine libre inhibe la mort cellulaire induite par  $PGE_2$  ainsi que l'interaction entre  $PGE_2$  et Bax (données non montrées). La cystéine 126 de Bax semble donc d'importance pour sa sensibilité à  $PGE_2$ . La liaison covalente cys- $15d\Delta^{12-14}PGJ_2$  peut impliquer les carbones C9 et C13 de la prostaglandine. Ce type de carbone nucléophile est absent de  $PGE_2$ . En revanche, 2 dérivés de  $PGE_2$  possèdent un tel carbone :  $PGA_2$  en C11 et 15-kéto-  $PGE_2$  en C13. Nous avons noté que  $PGA_2$  était lui-même capable d'induire

l'association de Bax à la mitochondrie. Nous avons donc étudié la possibilité de modéliser l'interaction entre le résidu cys126 et l'un de ces dérivés de PGE<sub>2</sub>. Les deux dérivés peuvent être positionnés en regard de la cystéine, à une distance que ne semble pas incompatible avec la formation d'une liaison covalente. La modélisation ne permet donc pas de trancher quant au dérivé de PGE<sub>2</sub> potentiellement capable d'établir une liaison covalente avec Bax.

Compte tenu des régions de Bax impliquées dans la liaison de PGE<sub>2</sub> et de la similarité de structure entre les protéines de la famille de Bcl-2, il est légitime de s'interroger sur la possibilité de PGE<sub>2</sub> d'interagir avec d'autres protéines de cette famille. En ce qui concerne Bak, l'autre effecteur de la perméabilisation mitochondriale, nous n'avons pas observé de différence de sensibilité à PGE<sub>2</sub> entre des primocultures de GBM traitées ou non avec un antisens anti-Bak, quel que soit le niveau d'expression de Bax. Il convient cependant de nuancer cette observation, dans la mesure où le rôle de Bak dans la sensibilité de ces cellules à l'apoptose apparaît mineur. Nous avons en revanche observé que la surexpression de Bcl-2 protégeait les cellules de l'apoptose induite par PGE<sub>2</sub>. La question se pose donc de savoir si Bcl-2 agit en tamponnant Bax ou bien PGE<sub>2</sub>. Les cellules qui surexpriment Bcl-2 semblent conserver une distribution diffuse, cytosolique de Bax lorsqu'elles sont microinjectées par PGE<sub>2</sub>, par opposition à la distribution punctiforme de Bax dans les cellules ne surexprimant pas Bcl-2. Cette observation pourrait être en faveur d'une possible interaction entre PGE<sub>2</sub> et Bcl-2, sans toutefois la démontrer.

L'interaction de Bax avec des lipides n'a été évoquée jusqu'ici dans la littérature qu'avec une bicouche lipidique. Aucune donnée concernant un lipide capable d'induire le changement de conformation de Bax n'a en revanche été montrée.

Certaines protéines de la famille de Bcl-2 sont capables d'interagir avec Bax et d'induire son activation. C'est le cas de Bid, qui sous sa forme p13tBid peut interagir avec Bax et l'activer. Cette interaction semble consister en une liaison électrostatique entre un résidu chargé positivement dans le domaine BH3 (Arg84) de Bid et un résidu chargé négativement dans l'hélice  $\alpha 1$  de Bax (Asp33) (cf revue, en annexe 1). Cette interaction se ferait aux dépens d'une interaction intramoléculaire entre les résidus D33 et K64 de Bax. Le mécanisme exact responsable du changement de conformation reste à déterminer. Il semble en effet peu probable que la simple rupture d'une interaction électrostatique soit suffisante pour induire la transition conformationnelle. Une fois Bax activé, l'affinité de Bid pour Bax chute, entraînant la dissociation du complexe.

Il semble que l'interaction entre Bax et PGE<sub>2</sub> soit différente de l'interaction Bid/Bax, puisqu'elle semble persister après le changement de conformation de Bax. Les régions de Bax impliquées dans ces interactions semblent également différentes. La question d'une possible coopérativité entre PGE<sub>2</sub> et les protéines BOP (BH3-only proteins) capables d'activer directement Bax se pose donc. A l'appui de cette hypothèse, la régulation entre la production de PGE<sub>2</sub> (par l'intermédiaire de la synthèse de mPGES-1) et la synthèse de certaines protéines BOP (Puma, Noxa) sont sous le contrôle de p53. Nous avons observé que, malgré l'effet inhibiteur de PGD<sub>2</sub> sur l'apoptose induite par PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> était incapable d'inhiber l'apoptose induite par la microinjection d'un peptide BidBH3. Cependant, ce résultat n'exclut pas la possibilité d'une action synergique entre PGE<sub>2</sub> et une protéine de type tBid. L'augmentation de PGE<sub>2</sub> intracellulaire pourrait alors être considérée comme un facteur sensibilisateur, abaissant le seuil d'activation de Bax par d'autres activateurs (cf revue). Le fait que PGD<sub>2</sub> soit capable de protéger partiellement des cellules exprimant Bax de la mort induite par des inducteurs dont les cibles sont variées (UVB, staurosporine, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) nous pousse à envisager l'hypothèse que l'augmentation du niveau de PGE<sub>2</sub> intracellulaire pourrait être un phénomène assez universel accompagnant le déclenchement de la mort programmée. Des données de la littérature, confirmées dans notre modèle, montrent que la staurosporine induit une augmentation de la production de PGE<sub>2</sub> par les cellules. Cette observation reste cependant à confirmer sur différents types de lignées et de stimuli apoptotiques.

Enfin, la nature du changement de conformation induite par PGE<sub>2</sub> reste encore à déterminer. L'action de PGE<sub>2</sub> sur Bax semble pouvoir conduire à l'apparition d'un Bax pleinement actif, capable de perméabiliser la membrane mitochondriale, tel que décrit par Hsu et al. Cependant, nous n'avons pas pu observer la formation de dimères de Bax suite à son activation par PGE<sub>2</sub>. De la même façon, PGE<sub>2</sub> est capable d'activer Bax $\Delta$ C. Or nous avons observé que le Bax $\Delta$ C induisait la mort cellulaire sous forme monomérique, tout en restant capable de se dimériser en solution sous l'effet de détergents (cf Er et al. en annexe). Ces résultats indiquent que la conformation active de Bax telle que décrite par Hsu et formant des dimères n'est pas nécessairement l'unique conformation capable d'induire la perméabilisation membranaire.

Ce travail révèle donc le rôle complexe joué par la prostaglandine E<sub>2</sub> dans la régulation de la sensibilité à l'apoptose des cellules cancéreuses, fortement dépendant du contexte cellulaire et tissulaire.

Les prostaglandines semblent ainsi faire partie des petites molécules ubiquitaires capables de modifier de façon plus ou moins drastique la conformation des protéines, induisant une modulation de leur fonction, parmi lesquelles NO, ATP, Ca<sup>2+</sup> ou NADH<sup>+</sup> par exemple. Il apparaît donc important de tenter de se rapprocher au maximum des conditions biologiques réelles pour étudier la régulation des processus de survie des cellules cancéreuses en limitant l'observation d'artéfacts.

## **Annexes**

Annexe 1 : revue supplémentaire

Lalier L., Cartron P.F., Juin P., Nedelkina S., Manon S., Bechinger B. and Vallette F.M. "Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis".

Annexe 2 : article supplémentaire

Er E., Lalier L., Cartron P.F., Oliver L. and Vallette F.M. "Control of Bax homo-dimerization by its carboxy-terminal".

## **Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis**

*Lisenn LALIER*<sup>1,2</sup>, *Pierre-François CARTRON*<sup>1,2</sup>, *Philippe JUIN*<sup>1,2</sup>, *Svetlana NEDELKINA*<sup>3,4</sup>, *Stephen MANON*<sup>5,6</sup>, *Burkhart BECHINGER*<sup>3,4</sup> and *François M. VALLETTE*<sup>1,2</sup> ¶.

1. INSERM U601, F-44000 Nantes France
2. Université de Nantes, Faculté de Médecine, 9 Quai Moncousu F-44035 Nantes. Cedex 01 France.
3. CNRS LC3-UMR7177, F-67070 Strasbourg, France
4. Université Louis Pasteur, Institut/Faculté de Chimie, 4, rue Blaise Pascal, F-67070 Strasbourg, France.
5. Institut de Biochimie et Génétique, Cellulaires, UMR5095 CNRS, 33077 Bordeaux Cedex, France
6. Université de Bordeaux 2, 1 rue Camille Saint Saens, 33077 Bordeaux Cedex, France

¶ Corresponding author

François M. Vallette : INSERM U601, Université de Nantes, Faculté de Médecine, 9 Quai Moncousu F-44035 Nantes. Cedex 01 France.  
Tel : 33 240084081 ; Fax : 33 240084082  
[Francois.vallette@univ-nantes.fr](mailto:Francois.vallette@univ-nantes.fr)

**Abbreviation:** BOPs: BH3 only proteins; pBcls: proteins of the Bcl-2 family; MOM: mitochondrial outer membrane; ART: Apoptosis Regulating Target domain; CT: C-terminal end; NT: N-terminal end; CLIC: Cytosolic Locked In Conformation; CLAC: Cytochrome c Liberation Associated Conformation.

**Acknowledgments:** authors of this review are supported by the ANR grant “molecular mechanisms of Bax activation”, INSERM (FMV), CNRS (BB, SM) and the “Ligue National contre le Cancer” (FMV)

[Apoptosis](#). 2007 May;12(5):887-96.

**Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis.**

[Lalier L](#), [Cartron PF](#), [Juin P](#), [Nedelkina S](#), [Manon S](#), [Bechinger B](#), [Vallette FM](#).

INSERM U601, F-44000 Nantes, France.

## ABSTRACT

The mitochondrial apoptotic pathway is a highly regulated biological mechanism which determines cell fate. It is defined as a cascade of events, going from an apoptotic stimulus to the MOM permeabilization, resulting in the activation of the so-called executive phase. This pathway is very often altered in cancer cells.

The mitochondrial permeabilization is under the control of the Bcl-2 family of proteins (pBcls). These proteins share one to four homology domains (designed BH1-4) with Bcl-2, and are susceptible of homo- and/or hetero-dimerization. In spite of a poor amino-acid sequence homology, these proteins exhibit very similar tertiary structures. Strikingly, while some of these proteins are anti-apoptotic, the others are pro-apoptotic. Pro-apoptotic proteins are further divided in two sub-classes: multi-domains proteins, among which Bax and Bak, which exhibit BH1-3 domains, and BH3-only proteins (or BOPs). Schematically, BOPs and anti-apoptotic proteins antagonistically regulate the activation of the multi-domain proteins Bax and Bak and their oligomerization in the MOM, the latter process being responsible for the apoptotic mitochondrial permeabilization.

Considering the critical role of Bax in cancer cells apoptosis, we focus in this review on the molecular events of Bax activation through its interaction with the other proteins from the Bcl-2 family. The mechanism by which Bax triggers the MOM permeabilization once activated will be discussed in some other reviews in this special issue.

The mitochondrial insertion of the many signals arising from different cellular compartments and functional pathways during apoptosis are essential for the completion of this cell death programme. This integration as well as the execution of apoptosis is controlled by the Bcl-2 proteins, (pBcls), some of which undergo a change of conformation and cellular localization at the onset of apoptosis <sup>1</sup>. Two proapoptotic proteins of this family, Bax and Bak, are essential for the completion of apoptosis. In the case of Bax, the induction of apoptosis and the associated change in its cellular localization reflects the ability to undergo a conformational change from a solution to integral membrane conformation <sup>2</sup>. Numerous works have shown that this conformational change is dependent of both the expositions of the C-terminal and the N-terminal extremities of Bax, which are contemporary of Bax mitochondrial insertion into the outer membrane of mitochondria. Current models predict that the conformational changes involved in the translocation of Bax toward the organelle are associated with profound changes in secondary and, especially, tertiary structure of the protein. Given the importance of the biological activities of Bax the latter process is likely to be a major regulatory checkpoint for apoptosis and a putative major pharmacological target in numerous diseases <sup>3</sup>.

## I. Existence of two major stable conformational states of Bax

Bax is usually considered to adopt two stable conformational states: native Bax, present in the cytosol (therefore called CLIC for “Cytosolic Locked In Conformation”) and fully activated Bax, related to the mitochondrial permeabilization (therefore called CLAC for “Cytochrome c Liberation Associated Conformation”).

In aqueous solutions, Bax appears as a globular protein <sup>4</sup> with a structure very similar to that of some of the other pBCLs, either proapoptotic (Bid and p15tBid) or antiapoptotic (Bcl-xl and Bcl-2) <sup>5</sup>. Bax is composed of 9 alpha helices separated by rather unstructured loops. Two central helices (H $\alpha$ 5, and in a lesser extend H $\alpha$ 6) are mostly hydrophobic. They constitute the core of the protein and are embedded within the other 7 helices, which have amphipathic properties and keep their hydrophilic residues exposed to the exterior. This organization enables the protein to remain soluble in its native cytosolic conformation. Yet, some authors have reported the existence of mitochondria-associated Bax in healthy cells. This apparent discrepancy is discussed below.

Helices  $\alpha$ 5 and  $\alpha$ 6 are surrounded on one side by helices  $\alpha$ 1 and  $\alpha$ 2, on the other side by helices  $\alpha$ 3 and  $\alpha$ 4 and above by H $\alpha$ 7 and  $\alpha$ 8 (**figure 1**). This structure is very similar to that determined for anti-apoptotic proteins pBcls, namely Bcl-2 and Bcl-xl, by crystallography or NMR studies <sup>5</sup>. NMR studies revealed an ordered conformation of H $\alpha$ 1 and H $\alpha$ 2 along the H $\alpha$ 5- $\alpha$ 6 backbone. Helix  $\alpha$ 1 and  $\alpha$ 2 are linked by a long, poorly structured loop (18 residues). Similarly to Bcl-xl, a fragment of Bax H $\alpha$ 1- $\alpha$ 2 loop (Glu44-Ala46) seems to establish bonds with residues of H $\alpha$ 6 (Ile133 and Met137), suggesting that the loop participates to the compacted structure observed in solution <sup>4</sup> (**figure 1**).

On the surface of both Bcl-2 and Bcl-xl, the three highly conserved homology domains (BH1, 2 and 3) define the entry of an elongated hydrophobic pocket. This structural occurrence has been largely assigned as the basis of their anti-apoptotic function since this hydrophobic cleft was shown to mediate the interaction with other BH3-proteins. The 3 Bcl-2-homology domains present in Bax sequence (BH1, 2 and 3) also define a hydrophobic pocket although Bax BH3 domain is packed closer to the core of the protein than the homologous domain of the anti-apoptotic pBcls <sup>4</sup>. Bax hydrophobic pocket is occupied in its native state by the hydrophobic helix  $\alpha$  9 of the protein and several of its polar residues (i.e. Thr172, Thr174, Thr182, Thr186) are exposed to solvent, increasing the protein solubility. By analogy to the C-terminal transmembrane domain of Bcl-2 and Bcl-xl, this helix was

proposed to be a sequence responsible for Bax anchoring to the MOM, but it is clear that in the native conformation resolved by Suzuki et al.<sup>4</sup> this domain is tightly sequestered.

At last, a short sequence is highly conserved in the BH1 domain, namely the residues NWGR at the N-terminal end of H $\alpha$ 5. Especially the W residue (Trp) was shown to establish hydrophobic links with residues on H $\alpha$ 7-8, (i.e. BH2 domain)<sup>5</sup>. Giving the high sequence homology between Bax H $\alpha$ 7-8 and Bcl-xl H $\alpha$ 7-8, it seems highly probable that similar links participate to stabilize Bax water-soluble structure.

Thus, the described conformation of native, cytosolic Bax suggests a closely-packed, globular protein. It seems unlikely that hidden domains of the protein can interact with other proteins unless undergoing some conformational modifications, relaxing the structure and enabling novel exogenous or endogenous interactions.

During apoptosis, major conformational change occurs, making Bax switch from a cytosolic to a mitochondrial, membrane-inserted protein. In this activated form, several domains, formerly hidden in the native conformation, become exposed. In particular, hydrophobic domains are accessible, increasing Bax affinity for biological membranes. The exposure of these domains upon the induction of apoptosis, which has been monitored by epitope-specific antibodies mainly by Richard Youle's group, provides structural insight to the activation of Bax<sup>6-9</sup>. The induction of conformational change of Bax by pH or detergent provokes a similar pattern of epitopes' exposure to that observed during apoptosis, suggesting that the activated Bax represents an alternative stable conformation<sup>7, 10</sup>. First, in all cases, the exposure of the N-terminal part of Bax H $\alpha$ 1 (residues 12-24, recognized by the widely used 6A7 antibody) came together with Bax ability to homo- or hetero-dimerize with Bcl-xl. Further studies indicated that other domains are also exposed in detergent-activated Bax, namely the BH3 domain and the N-terminal part of the H $\alpha$ 5 as assessed by the use of epitope-specific antibodies<sup>11, 12</sup>. This suggests that the globular form of the protein is totally abolished when the protein is undergoing a type of "inside-out" transition before (or during) membrane integration. It should be noted however, that differences might exist when the structures in micelles and in phospholipids bilayer are compared to each other and that the membrane-associated conformation of Bax has not been structurally resolved yet.

However, among the domains of the protein exposed in the "activated" protein, several have been suggested to play an important role in the protein function.

The N-terminal part of Bax (i.e. Aa20-37) was shown to contain a mitochondrial targeting sequence: the first  $\alpha$  helix sequence is able to target RFP to the mitochondria and

inversely, the deletion of Bax H $\alpha$ 1 abolishes its mitochondrial localization<sup>13</sup>. Yet, this sequence is insufficient to trigger the protein insertion into the mitochondrial outer membrane<sup>13</sup>. Of note, the first 20 amino-acids of Bax sequence play an inhibitory role for Bax mitochondrial localization and as been called “Apoptosis Regulating Target” domain (ART)<sup>14</sup>. Interestingly, the targeting can be instated by deleting the domain or by replacing the Bax C-terminal helix with that of Bcl-2<sup>14</sup>, suggesting a close cooperation between both N- and C- terminal extremities of Bax. Of note, the junction between the ART and the addressing domains encompass the epitope recognized by the anti-conformational antibody 6A7.

Bax BH3 domain is believed to be another important domain in the protein, partly based on the observation that mutations or deletions of BH3 residues impair Bax binding properties and/or pro-apoptotic function<sup>15</sup>. Moreover, the BH3 domain is present in all pro-apoptotic pBcls, and in most of their anti-apoptotic counterparts. It was first thought to be involved in the ability of these proteins to form homo- or hetero-oligomers. This assumption was demonstrated in the case of Bcl-2 and Bcl-xl binding of other BH3 proteins<sup>16,17</sup>. Indeed, the BH3 peptides which mimic Bax BH3 domain are able to interact with the hydrophobic groove present on the surface of these proteins and formed by the BH1, 2 and 3 domains. Besides, Bax BH3 peptide is able to inhibit Bax-Bcl-xl interaction, what insists on the specificity of the BH3-dependent binding<sup>18</sup>.

The disruption of the Bax globular, closely-packed structure also suggests exposure of the H $\alpha$ 5-H $\alpha$ 6 hairpin, which is otherwise profoundly embedded in the native conformation. These helices are similar to the pore-forming domain of colicins and diphteria toxin. Mutagenesis experiments conducted by Nouraini et al.<sup>19</sup> showed that the central alpha helices, H $\alpha$ 5- $\alpha$ 6, are the potential pore-forming domains of Bax. More recent studies showed that H $\alpha$ 5- $\alpha$ 6 are transmembrane domains<sup>20,21</sup> and that they are necessary to Bax insertion into the MOM, but not for its addressing to the organelle<sup>11</sup>. Both isolated  $\alpha$ 5 and  $\alpha$ 6 helices of Bax (and from other pBcls) were shown to insert into synthetic lipid membrane where they form pores<sup>21,22</sup>.

The last potentially important domain exposed in detergent-treated Bax is the C-terminal  $\alpha$ 9 helix. This helix is bound to Bax hydrophobic groove in the native conformation and is thought to participate to the conformational stability. Of note, only one polar residue of H $\alpha$ 9 faces towards the hydrophobic groove, namely S184, while the others are susceptible to increase Bax solubility<sup>4</sup>. Mutation, deletion or phosphorylation of S184 influences Bax

localisation<sup>23, 24</sup>. By homology to anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-x1, the  $\alpha 9$  helix was proposed to be the tail-anchoring sequence for Bax mitochondrial localisation. This role is still currently discussed, since Bax mitochondrial translocation can occur despite of C-terminal deletion in some systems<sup>13, 25</sup>. Nevertheless, Bax H $\alpha 9$  was shown to be involved in Bax insertion into pure lipid membranes and in the subsequent pore formation.

Both CLIC and CLAC are very stable conformational states of the protein but, it is not clear that they are the only physiological Bax conformers. Indeed, many studies revealed that intermediate conformations could be observed, some of them being reversible., Hsu et al.<sup>7</sup> pointed out on the fact that distinct detergents could produce various effects on Bax conformation and its ability to form dimers. The authors actually described 3 different stages in Bax conformation, as judged by its ability to form dimers and to expose the 6A7 epitope. Stage 1, observed without detergent or with zwitterionic detergent (CHAPS), corresponds to the native (CLIC) conformation, Bax does not interact with the 6A7-antibody and is unable to dimerise. Stage 2 is observed when Bax is treated with anionic detergents or non ionic detergents with alkyl (W1) or acyl sorbitan ester groups (TWEEN 20); it is 6A7-positive and is capable to hetero-dimerise, but not to form homo-dimers. Finally, stage 3 is the activated-like conformation where Bax is 6A7-positive and can homo- or hetero-dimerise (CLAC). The latter stage is obtained by treating Bax with non ionic, alkylphenyl moieties-containing detergents. These compounds might force their entry into the Bax hydrophobic groove, inducing a sufficient perturbation of the structural stability and in this way trigger the conformational transition.

Some other groups reported slight conformational modifications of Bax which do not support cell death induction and are sometimes reversible<sup>10, 12</sup>. These studies report physiologically relevant events, either a sub-lethal apoptotic stimulus or a change in the protein environment<sup>10, 12</sup>, namely a subtle pH modification, previously described to occur during the induction of apoptosis<sup>26</sup>. Both studies suggest that these conditions can result in the exposure of some epitopes without the release of mitochondrial cytochrome c and cell death. In both cases, the N-terminal  $\alpha 1$  helix becomes accessible, followed by Bax translocation to the mitochondria. Makin et al.<sup>12</sup> have reported the formation of a mitochondrial complex including Bax, with an apparent size of 46kD, thus not excluding homodimerisation. Cartron et al.<sup>10</sup> also showed that exposure of the C-terminal part of H $\alpha 1$  and that of BaxBH3 occur simultaneously. Secondary, the N-terminal part of H $\alpha 1$  and H $\alpha 5$  become exposed, concomitant with Bax translocation and insertion into the MOM, inducing

cytochrome c release. This step is accompanied by a conformational transition during which the protein becomes resistant to mild proteolysis (**Figure 2**).

We propose that Bax can adopt two stable conformational states, either inactive and soluble (CLIC), or activated, integrated into the MOM and responsible for cell death (CLAC). Nevertheless, in the cell, Bax is submitted to many environmental factors, varying in time, which slightly loosen the globular structure and enable protein-protein interactions. This loosening of the structure might be a required, early event necessary but not sufficient to induce Bax conformational transition under physiological conditions. The further binding of membrane compounds or of other BH3-containing proteins might be the determining event triggering the conformational change.

## **II Bax interaction with membranes**

### ***II.1 Interaction with membranes***

Bcl-2 and Bcl-xl both present a hydrophobic C-terminal tail which has been shown to be necessary to their association to membranes. Similarly, the Bax C-terminal end is a quite hydrophobic  $\alpha$  helix. It was proposed that Bax H $\alpha$ 9 could be responsible for Bax mitochondrial targeting during apoptosis. Wolter et al.<sup>6</sup> showed that GFP-Bax translocation during apoptosis was abrogated when the 21 last amino-acids were deleted and that lack of binding was not due to an increased interaction of full-length GFP-Bax with Bcl-2 or Bcl-xl. Nechustan et al.<sup>23</sup> later established that a serine in position 184 determined Bax localisation. Indeed, the mutation of S184 to a charged amino-acid (K, D or E) abolished Bax mitochondrial targeting even under apoptotic conditions. Interestingly, it was later shown that this inhibition, due to a charged residue, was reproduced by AKT-induced phosphorylation of S184<sup>24</sup>. Conversely, S184 deletion or mutation to valine induced a constitutive mitochondrial localisation, unrelated to apoptosis induction<sup>23</sup>.

Bax insertion into ER membrane vesicles<sup>27</sup> and pure lipid micelles<sup>25</sup> was also tested *in vitro*. These experiments show that 3 sequences in Bax were potential membrane-anchors, namely the H $\alpha$ 5- $\alpha$ 6 hairpin, H $\alpha$ 1 and H $\alpha$ 9. Under non apoptotic conditions, Bax monomer seems to associate at the same level to either ER (endoplasmic reticulum) liposomes or mitochondrial liposomes<sup>28</sup> suggesting that Bax association with membrane lipids is not absolutely dependent on the presence of cardiolipin in healthy cells.

The interaction between H $\alpha$ 9 and membrane lipids thus seems to be responsible for the membrane localisation of Bax<sup>28</sup>, despite being not specific for mitochondria since Bax can also be found on ER in these systems. Moreover, Bax binding to the membranes through its C-terminal  $\alpha$  helix is not sufficient to induce apoptosis, even though it can sometimes appear necessary<sup>20</sup>. To induce apoptosis, Bax has to undergo an additional conformational change responsible for a more complete insertion, as reported in cells<sup>29</sup> or in acellular systems<sup>20, 30</sup>. This conformational transition comes together with Bax oligomerisation. The previous observations are actually consistent with the hypothesis that H $\alpha$ 9 removal from the Bax hydrophobic groove could facilitate Bax activation, if not even trigger it. Confirming this assumption, we recently reported that point mutations on Bax H $\alpha$ 9 (P168V and S184V), previously shown to remove H $\alpha$ 9 from the groove formed by the central helices<sup>23</sup>, induced a slight modification in Bax conformation, but yet not enough to activate the protein<sup>11</sup> (**figure 2**).

### ***II.2 Specific interactions with mitochondria***

The mitochondrial outer membrane is definitively not a simple lipid membrane. First, the MOM lipid composition is not quite specific. Second, many membrane-associated and membrane-inserted proteins are part of the MOM<sup>31</sup>.

In healthy HeLa cells, Bax is constitutively partially mitochondrial. Bax activation is therefore monitored by its membrane-insertion and oligomerisation<sup>29</sup>. In this cellular system, Roucou et al.<sup>32</sup> showed that Bax oligomerisation induced by tBid was dependent on a mitochondrial protein which is different from VDAC. Consistent with this, Kuwana et al.<sup>28</sup> observed in a stepwise simplified system of reconstituted vesicles that Bax mitochondrial oligomerisation induced by tBid happened in MOM vesicles and not in mitochondrial liposomes. This work suggests that tBid-induced Bax oligomerisation requires a MOM protein partner, drastically improving Bax-dependent vesicle permeabilisation. This assumption has been otherwise demonstrated, as described below.

Contrary to other proteins from the family, Bax contains a mitochondrial targeting sequence included in the N-terminal H $\alpha$ 1 (Aa20-37)<sup>13</sup>. A Bax variant lacking the 19 first residues, thus similar to Bax $\Delta$ ART<sup>14</sup>, called Bax  $\Psi$  is constitutively bound to the mitochondria in some nervous system tumors<sup>33</sup>. Our group demonstrated that a chimera protein, built from this 18 amino-acids sequence addition to the N-terminal end of a cytosolic protein (RFP), became mitochondria-associated<sup>13</sup>. Strikingly, Bax N-terminal targeting to the MOM was inhibited by the addition of Aa20-37-RFP in a dose-dependent manner, while

RFP-Bax CT( $\Delta$ S184) had no inhibitory effect, although exhibiting a mitochondrial localisation. This competition between the first two compounds suggests the existence of a rate-limiting receptor for the binding of Bax N-terminal addressing sequence. Yet, H $\alpha$ 1 mitochondrial addressing is not sufficient to induce Bax mitochondrial insertion and the subsequent mitochondrial permeabilisation. Indeed, mutations on H $\alpha$ 5- $\alpha$ 6 abrogating their pore-forming activity prevented Bax $\Delta$ 1-19 from membrane insertion and toxicity<sup>13</sup>.

Similarly, Makin et al.<sup>12</sup> reported a change in Bax N-terminal conformation which was reversible and not always accompanied by cytochrome c release. This implies that the Bax conformational switch does not happen, since fully activated Bax (i.e TritonX100-treated or octylglucoside-treated Bax) provokes mitochondrial permeabilisation and cell death<sup>30, 34</sup>. This study therefore suggests that Bax homodimerisation can occur at the MOM without its conformational switch, or that another protein with a similar molecular weight might dimerise with Bax at the MOM in a reversible manner.

Bax N-terminal and C-terminal ends seem to be able to mediate its association to the mitochondria but the biological significance of both signals appears different. Indeed, according to Bax resolved structure<sup>4</sup>, the exposure of its C-terminal correlates with the exposure of Bax hydrophobic groove, thus enabling further interactions with mitochondrial membrane. The Bax C-terminus could thus be regarded as an inhibitory domain for Bax interaction with other Bcl-2-family proteins and consequently, as proposed by Arokium et al.<sup>11</sup>, would constitute a second ART domain (C-ART). Interestingly, both N- and C-ART seem to participate to the native conformation stabilisation since the double deletion ( $\Delta$ 1-19,  $\Delta$ H9) increases the toxicity of N-ART deleted Bax<sup>11</sup>. Thus, Bax targeting to mitochondria might involve simultaneous or sequential removal of both N-ART and C-ART inhibitions.

There must be a first event unmasking the addressing sequence located within the first alpha helix<sup>13</sup>. Actually, this stimulus is most often sufficient to trigger Bax activation. A possible explanation to this is that the H $\alpha$ 1 takes part to stability of the hydrophobic groove as removing N-ART and H $\alpha$ 1 away from the core of the protein may be sufficient to a profound destabilization of the protein structure leading in particular to the exposure of the Bax BH3 domain.

To conclude this chapter, Bax targeting to the mitochondria seems to be necessary but not sufficient to induce a conformational transition to a fully active Bax conformation but would rather decrease the activation threshold of the protein.

### **III Bax interaction with BH3-only proteins**

BH3-only proteins are a sub-group of the Bcl-2 family. They share the particularity to bear only one homology domain to Bcl-2 (BH3). This BH3 domain is exposed in all BH3-only proteins (BOPs) except Bid<sup>35</sup>. As a consequence, BOPs are either transcriptionally (Puma, Noxa) or post-translationally inhibited (Bad, Bim) in healthy cells. As an exception, Bid exists as an inactive, cytosolic protein in healthy cells and undergoes a proteolytic cleavage responsible for its activation (tBid) and BH3 exposure during apoptosis. BOPs are incapable of inducing cell death in the absence of both Bax and Bak. Their function in apoptosis can be resumed by their BH3 domain and mimicked by BH3-peptides<sup>35</sup>, which suggests that BH3 is the critical domain for their interaction with other proteins from the family and for their function.

tBid was shown to directly induce Bax activation, whereas some other BOPs function (Bad, Noxa) is rather mediated by anti-apoptotic proteins (Bcl-2, Bcl-xl or Mcl-1). BOPs could thus be split in two categories: activators of multidomain proteins (Bid-like) and repressors of anti-apoptotic proteins (Bad-like)<sup>35</sup>.

We will use the tBid-Bax interaction as a model: tBid was shown to provoke a conformational change at the Bax N-terminal end, enabling it to form mitochondrial oligomers and to induce MOM permeabilization<sup>36, 37</sup>. This activation is dependent on Bid BH3 integrity and can be reproduced by the use of a sole peptide encompassing for Bid BH3 domain<sup>37, 38</sup>. The interaction between Bcl-2-like proteins and BH3 peptides or proteins is mediated by the hydrophobic groove. It is thus tempting to postulate that the interaction between tBid and Bax could involve the Bax hydrophobic cleft. Wang et al.<sup>39</sup> demonstrated that Bid interaction with either Bcl-2 or Bax was conditioned to Bid-BH3 and Bcl-2- or Bax-BH1 integrity. Besides, the removal of Bax C-terminal H $\alpha$ 9 does not impair tBid-induced function, even if pore formation is altered<sup>40</sup>. Consistent with this, Yethon et al.<sup>30</sup> observed that incubating Bax with tBid induced no conformational change of Bax unless liposomes were added, possibly sequestering Bax H $\alpha$ 9. In the same idea, Bax detergent-induced unfolding<sup>40</sup> or mutational activation (Bax $\Delta$ ART and Bax P13V)<sup>41</sup> decreases tBid ability to interact with Bax and induce its membrane-insertion. The Bax hydrophobic groove is thus likely to take part to tBid-Bax interaction.

To further characterize Bax-tBid interaction, we used mutagenesis strategies and pull-down experiments between His-tagged tBid and Bax to demonstrate the critical role of 3 residues of Bid BH3 in tBid-Bax interaction, namely R84, G94 and M97<sup>42</sup>. We next observed

that Bax H $\alpha$ 1 alone was able to interact with BidBH3 and with tBid, whereas a point mutation D33A in this helix abolished the ability of BidBH3 and tBid to interact with Bax(D33A) or Bax H $\alpha$ 1(D33A). Of note, Puma and PumaBH3 were all the same capable of binding H $\alpha$ 1 in the presence of its D33 residue, while neither Bad nor BadBH3 could. The specificity of this interaction is underlined by the inhibitory effect of a peptide encompassing BaxH $\alpha$ 1 on tBid-Bax binding. Since both D33 (Bax H $\alpha$ 1) and R84 (Bid BH3) residues play a critical role in the interaction, we wondered if the mutation of one of these charged residues could be counteracted by a mutation of the other one. As hypothesized, while BaxD33R and tBidR84D could not interact with wt-tBid and wt-Bax respectively, the interaction was restored between BaxD33R and tBidR84D. This shows that Bax interacts with tBid through an electrostatic interaction involving the D33 (Bax H $\alpha$ 1) and the R84 (Bid BH3) residues <sup>42</sup> (**figure 3**). We later demonstrated that such an electrostatic interaction exists in the inactive conformation of Bax between the BaxD33 and BaxK64 residues, the latter being part of the Bax BH3 domain <sup>11</sup>. Artificial disruption of this bond through the mutation of one of these residues results in a slight conformational change of the protein, as observed by the exposure of normally hidden epitopes, namely the BH3 (residues 57-72) and the C-terminal part of H $\alpha$ 1 (residues 24-33) <sup>11</sup> (**figure 3**).

We propose a model in which tBid could interact with the Bax hydrophobic groove and with Bax H $\alpha$ 1. The first hypothesis is that BidBH3 removes BaxH $\alpha$ 9 from the groove, thereby initiating the conformational change, with a subtle displacement of the BH1 domain (cf paragraph II.1). Once in the groove, high physical proximity between BaxD33, BaxK64 and BidR84 could disrupt the stabilizing bond D33-K64, thereby achieving the unfolding of the hydrophobic groove and the conformational transition of the protein. This implies that the N-terminal extremity of BidBH3 is located next to BaxBH3, i.e. with a parallel orientation to BaxBH3. This disagrees with the binding described between Bcl-x1 and BakBH3 <sup>43</sup>. The second hypothesis is that tBid could approach the solvent-exposed side of BaxBH3 to disrupt the Bax D33-K64 electrostatic bond, whereby the G94 and M97 residues of Bid stabilise the interaction with Bax. The disruption of the intramolecular bond could move H $\alpha$ 1 away from the rest of the protein. The displacement of H $\alpha$ 1 might be a sufficient event to trigger Bax unfolding, as suggested by the effects of calpain cleavage <sup>42</sup>. The disruption of the Bax D33-K64 bond might be sometimes completed by a concomitant loosening of Bax hydrophobic groove, finalising the destabilisation of the Bax conformation. This is consistent with the

observation suggesting a cooperation between liposomes, potentially sequestering H $\alpha$ 9, and tBid in recombinant Bax activation<sup>30</sup>.

Once Bax is activated, Bid affinity to the activated protein drastically decreases and Bid is released from the dimer, illustrating the so-called "hit-and-run" model of Bid-induced activation. This is in agreement with the fact that Bid is not found in Bax mitochondrial complexes during late apoptosis.

#### **IV Bax interaction with anti-apoptotic proteins from the Bcl-2 family**

##### ***IV.1 Bax binding to the proteins***

Bax interaction with anti-apoptotic proteins from the Bcl-2 family (Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1, A1) was already described in 1995 by Sedlak et al.<sup>44</sup>. Bcl-2-like anti-apoptotic proteins were later shown to function through sequestering the BH3 domain of BH3-containing proteins in their hydrophobic cleft, formed by BH1, 2 and 3<sup>45</sup>. This interaction did not appear to be very specific for the BH3 domain, since substitution of Bax BH3 by Bcl-2 BH3 did not alter the binding<sup>46</sup>. Despite of this, several residues in BaxBH3 have been shown to play a role in BaxBH3 binding to Bcl-2 or Bcl-xl, or deduced by sequence homology through the study of BakBH3 binding to the same proteins<sup>43</sup>. Namely, Bax residues D68, D71, E69 respectively establish hydrogen bonds with G145, G145 and R146, R107 on Bcl-2 and R139, G138, R100 on Bcl-xl. Among these residues, D68 and E69 appear to be particularly critical to Bcl-2 binding<sup>46</sup>. Besides, Bax hydrophobic residues K64, I66 and L70 are believed to face the hydrophobic groove of the anti-apoptotic proteins. Hirotani et al. also observed a role of Bcl-2 and Bcl-xl BH4 domain in their Bax binding ability<sup>47</sup>. Given the known structure of Bcl-2 and Bcl-xl, BH4 participates in stabilizing the hydrophobic groove. The deletion of BH4 or the mutation of some residues into charged amino-acids can stand for a change in the shape of the hydrophobic cleft, which may account for the loss-of-function of the protein.

It is noteworthy that the observation of Bax interaction with Bcl-2 or Bcl-xl under non apoptotic conditions sometimes requires the presence of detergents. Moreover, Bcl-2-like proteins have a greater binding capacity to Bax  $\Delta$ 1-19 and BaxD33A, as previously described. This fits well with our previous hypothesis that Bax structure loosening makes protein-protein interaction more likely. This also suggests that Bcl-2-like proteins can act either upstream or downstream Bax activation to inhibit its oligomerisation and the subsequent mitochondrial permeabilization.

Inversely, modifications responsible for alterations of the hydrophobic cleft alter the interactions between Bax and Bcl-2-like proteins. For instance, point mutations of residues

L130, G138, G159 (Bcl-xlBH1), Y195 (Bcl-xlBH2) or Y101 (Bcl-xlBH3) have all been demonstrated to impair the binding<sup>44,48</sup>.

It was recently shown that Bcl-2 interaction with the pro-apoptotic proteins (Bid or Bax in the study) induced a change in its conformation, responsible for a more complete insertion in the MOM<sup>49</sup>.

Some anti-apoptotic proteins, especially Bcl-xl, are capable of forming reversible homo-dimers in the cytosol of healthy cells. Jeong et al.<sup>50</sup> demonstrated that these dimers involved the binding of the C-terminal  $\alpha$  helix of one protein to the hydrophobic groove of the second one. Since the Bax structure is very similar to that of Bcl-xl under native conditions, Jeong et al.<sup>50</sup> reported a possible hetero-dimerisation between Bax and Bcl-xl involving the replacement of Bax H $\alpha$ 9 by Bcl-xl CT in the hydrophobic cleft. Yet, this interaction was only seen in the presence of detergents or with a C-truncated form of Bax, suggesting that a first modification in the structure of Bax is necessary to unlock the protein.

This type of interaction may be an alternative to the widely described binding of BaxBH3 domain in the hydrophobic cleft of anti-apoptotic proteins.

#### ***IV.2 Disruption of the interaction***

While studying the mechanism by which BOPs participate to Bax (and Bak) activation, some groups discovered that the interaction between Bax and Bcl-2-like proteins could be disrupted by natural (BOPs) or artificial compounds (BH3 peptides or non peptidic compounds)<sup>35, 38, 52-55</sup>. Quite strikingly, the disruption of this interaction can release activated Bax. The ability of BH3 peptides to release activated Bax from Bcl-xl was extensively studied by Moreau et al.<sup>18</sup>. This study demonstrates that native Bax incubated with Bcl-xl could be activated by the disruption of this interaction induced by BaxBH3 or BadBH3. In this experimental setting, Bcl-xl (or Bcl-2) can be seen as the necessary intermediates between some apoptosis inducers and Bax activation.

As previously proposed, we suggest that Bax interaction with anti-apoptotic Bcl-2-like proteins may require a first loosening of Bax structure, perhaps due to a physicochemical change of the protein cellular environment or to organic co-factors. This loosening of the structure is not sufficient by itself to induce Bax drastic conformational change, yet sufficient to enable protein-protein interactions. In particular, the removal of BaxH $\alpha$ 9 may allow BaxBH3 binding into Bcl-2 hydrophobic pocket. The stable engagement of BaxBH3 inside the groove would confirm Bax remodelling and enable the release of activated Bax after Bax displacement from the groove by an antagonist of the interaction. The study by Duglosz et al.

<sup>49</sup> provides an interesting insight to this hypothesis as they demonstrate that Bcl-2 inhibitory effect on Bax-induced mitochondrial permeabilization was dependent on a change in Bcl-2 conformation and insertion to the mitochondrial membrane through the H $\alpha$ 5- $\alpha$ 6. Of note, a conserved sequence in the BH1 domain, at the N-terminal part of H $\alpha$ 5 (NWGR), was shown to determine the binding between Bcl-2 or Bcl-xl and BH3 domains <sup>5</sup>. The arginine residue (Bcl-xl R139 and Bcl-2 R146) is involved in the BH3 pro-apoptotic proteins binding while the tryptophan residue (Bcl-xl W137 and Bcl-2 W144) is in tight contact with hydrophobic residues of BH2 domain, among which Bcl-2 W188 appears crucial to the groove stability. It is conceivable that such a change in Bcl-2 conformation would induce a comparable change in the ligand. Bcl-2 H $\alpha$ 5- $\alpha$ 6 engagement into the MOM should pull on BaxBH3 through Bcl-2R146/BaxD71 bond and induce the unfolding of Bax hydrophobic core. Bax H $\alpha$ 5- $\alpha$ 6 would therefore be exposed and insert into the MOM, in parallel with Bcl-2 H $\alpha$ 5- $\alpha$ 6. Bcl-2 would thus prevent Bax oligomerisation and the subsequent mitochondrial protein release.

This mechanism makes of Bcl-2-like proteins the mediators of some BOPs apoptotic function, helping them to induce cell death. This dual role of Bcl-2-like proteins might give rise to a new class of anti-cancerous therapeutic means, using the defensive arsenal of cancerous cells to selectively kill them.

## CONCLUSION

The aim of this review was to propose some molecular explanations to the surprising discrepancy between the tightly locked, native conformation of Bax described and its propensity to interact with the other proteins from the Bcl-2 family. We suggest that the conformation described by Suzuki et al. <sup>4</sup> might be a frozen model of Bax structural organization, yet it might be less locked in the cell. In the cytosol, Bax is submitted to a varying environment in terms of pH, ionic concentrations, ATP, NADH, oxygen and many other parameters. Environmental changes might induce stretches in Bax structure, loosening it and enabling the access of proteins to some critical regions of Bax. The interaction can either reduce the activation threshold of Bax and/or stabilize certain conformational states of the protein. Some anti-apoptotic proteins prevent Bax mitochondrial oligomerisation through sequestering Bax in the cytosol (Humanin, Ku70, 14-3-3 $\square$ ), away from its target. Other proteins bind the active conformation of Bax and are found at the mitochondria, where they prevent Bax oligomerisation and the subsequent cytochrome c release (clusterin, Bcl-2). Bax

interaction with proteins can also result in its activation<sup>2</sup>. Some interactions namely induce a sufficient disorder to trigger Bax conformational switch. Several crucial domains of Bax become exposed, enabling its homo-oligomerisation. The modality of oligomerisation is still unknown, but some elements could be part of the explanation. First, we demonstrated that Bax H $\alpha$ 1 could bind Bax BH3, which could also create intermolecular bonds. Then, data suggest that Bax C-terminal H $\alpha$ 9 could participate to the pore formation<sup>40</sup>, maybe through its polar residues. Finally, a study reported the possible formation of intermolecular disulfide bonds involving Bax C62 and C126 residues<sup>56</sup>. Bax mitochondrial localisation may create a favourable environment to the formation of such bonds. Any of these interactions, yet not exclusive, can stand for Bax oligomerisation but have to date not been demonstrated in pathophysiological conditions.

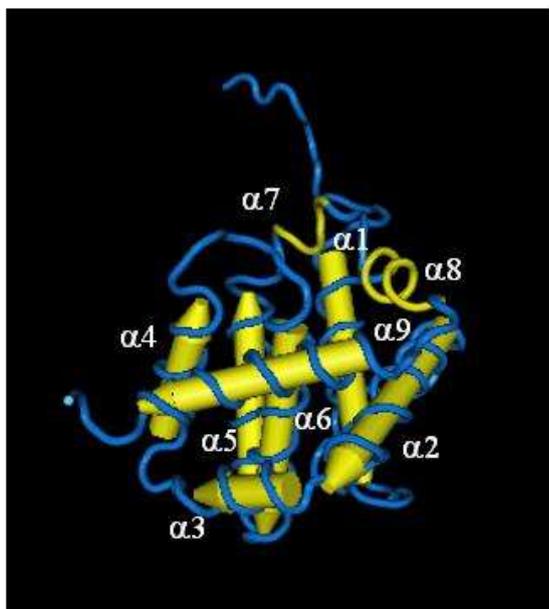
## REFERENCES

1. Adams JM, Cory S: Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family, *Trends Biochem Sci* 2001, 26:61-66
2. Er E, Oliver L, Cartron P-F, Juin P, Manon S, Vallette FM: Mitochondria as the target of the pro-apoptotic protein Bax, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 2006, 1757:1301-1311
3. Cartron PF, Juin P, Oliver L, Meflah K, Vallette FM: Impact of proapoptotic proteins Bax and Bak in tumor progression and response to treatment, *Expert Rev Anticancer Ther* 2003, 3:563-570
4. Suzuki M, Youle RJ, Tjandra N: Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization, *Cell* 2000, 103:645-654
5. Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW: Structural biology of the Bcl-2 family of proteins, *Biochim Biophys Acta* 2004, 1644:83-94
6. Wolter KG, Hsu Y-T, Smith CL, Nechushtan A, Xi X-G, Youle RJ: Movement of Bax from the Cytosol to Mitochondria during Apoptosis, *J. Cell Biol.* 1997, 139:1281-1292
7. Hsu YT, Youle RJ: Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations, *J Biol Chem* 1998, 273:10777-10783
8. Hsu YT, Youle RJ: Nonionic detergents induce dimerization among members of the Bcl-2 family, *J Biol Chem* 1997, 272:13829-13834
9. Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ: Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94:3668-3672
10. Cartron PF, Oliver L, Mayat E, Meflah K, Vallette FM: Impact of pH on Bax a conformation, oligomerization and mitochondrial integration, *FEBS Lett* 2004, 578:41-46
11. Cartron PF, Arokium H, Oliver L, Meflah K, Manon S, Vallette FM: Distinct domains control the addressing and the insertion of Bax into mitochondria, *J Biol Chem* 2005, 280:10587-10598
12. Makin GW, Corfe BM, Griffiths GJ, Thistlethwaite A, Hickman JA, Dive C: Damage-induced Bax N-terminal change, translocation to mitochondria and formation of Bax dimers/complexes occur regardless of cell fate, *Embo J* 2001, 20:6306-6315
13. Cartron P-F, Priault M, Oliver L, Meflah K, Manon S, Vallette FM: The N-terminal End of Bax Contains a Mitochondrial-targeting Signal, *J. Biol. Chem.* 2003, 278:11633-11641

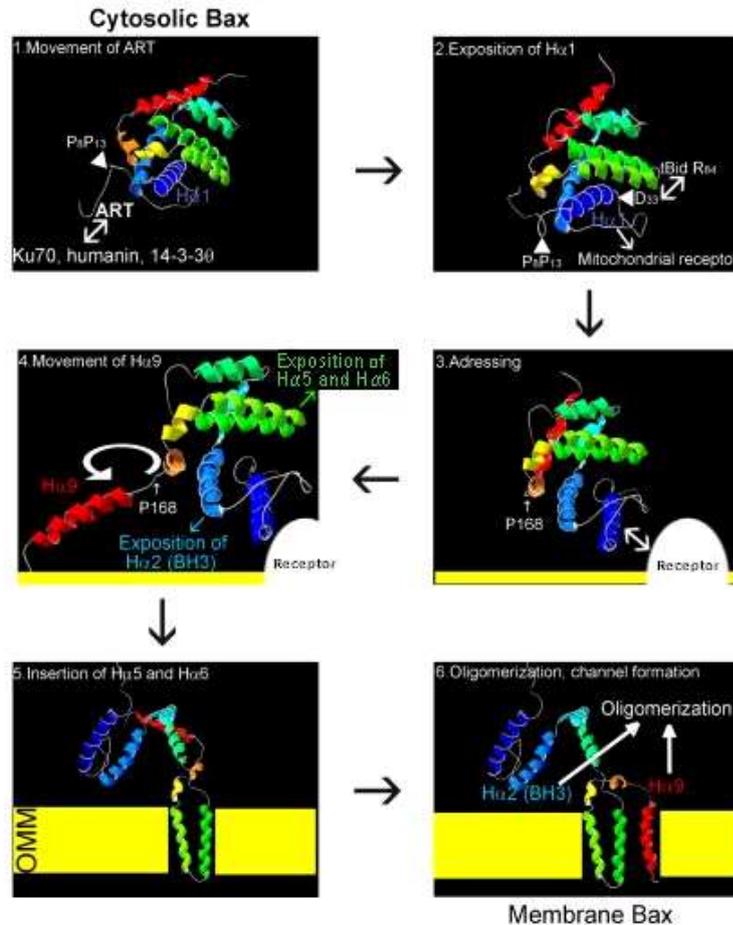
14. Goping IS, Gross A, Lavoie JN, Nguyen M, Jemmerson R, Roth K, Korsmeyer SJ, Shore GC: Regulated targeting of BAX to mitochondria, *J Cell Biol* 1998, 143:207-215
15. Wang K, Gross A, Waksman G, Korsmeyer SJ: Mutagenesis of the BH3 Domain of BAX Identifies Residues Critical for Dimerization and Killing, *Mol. Cell. Biol.* 1998, 18:6083-6089
16. Otter I, Conus S, Ravn U, Rager M, Olivier R, Monney L, Fabbro D, Borner C: The binding properties and biological activities of Bcl-2 and Bax in cells exposed to apoptotic stimuli, *J Biol Chem* 1998, 273:6110-6120
17. Conus S, Kaufmann T, Fellay I, Otter I, Rosse T, Borner C: Bcl-2 is a monomeric protein: prevention of homodimerization by structural constraints, *Embo J* 2000, 19:1534-1544
18. Moreau C, Cartron PF, Hunt A, Meflah K, Green DR, Evan G, Vallette FM, Juin P: Minimal BH3 peptides promote cell death by antagonizing anti-apoptotic proteins, *J Biol Chem* 2003, 278:19426-19435
19. Nouraini S, Six E, Matsuyama S, Krajewski S, Reed JC: The putative pore-forming domain of Bax regulates mitochondrial localization and interaction with Bcl-X(L), *Mol Cell Biol* 2000, 20:1604-1615
20. Annis MG, Soucie EL, Dlugosz PJ, Cruz-Aguado JA, Penn LZ, Leber B, Andrews DW: Bax forms multispanning monomers that oligomerize to permeabilize membranes during apoptosis, *Embo J* 2005, 24:2096-2103
21. Garcia-Saez AJ, Coraiola M, Serra MD, Mingarro I, Muller P, Salgado J: Peptides corresponding to helices 5 and 6 of Bax can independently form large lipid pores, *FEBS Journal* 2006, 273:971-981
22. Schendel SL MM, Reed JC.: Bcl-2 family proteins as ion-channels., *Cell Death Differ.* 1998, 5:372-380.
23. Nechushtan A, Smith CL, Hsu YT, Youle RJ: Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death, *Embo J* 1999, 18:2330-2341
24. Gardai SJ, Hildeman DA, Frankel SK, Whitlock BB, Frasch SC, Borregaard N, Marrack P, Bratton DL, Henson PM: Phosphorylation of Bax Ser184 by Akt regulates its activity and apoptosis in neutrophils, *J Biol Chem* 2004, 279:21085-21095
25. Antonsson B, Montessuit S, Lauper S, Eskes R, Martinou JC: Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria, *Biochem J* 2000, 345 Pt 2:271-278
26. Khaled AR, Kim K, Hofmeister R, Muegge K, Durum SK: Withdrawal of IL-7 induces Bax translocation from cytosol to mitochondria through a rise in intracellular pH, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96:14476-14481
27. Garcia-Saez AJ, Mingarro I, Perez-Paya E, Salgado J: Membrane-insertion fragments of Bcl-xL, Bax, and Bid, *Biochemistry* 2004, 43:10930-10943
28. Kuwana T MM, Perkins G, Ellisman MH, Latterich M, Schneider R, Green DR, Newmeyer DD. : Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane., *Cell* 2002, 111:331-342.
29. Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B, Martinou JC: Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells, *J Biol Chem* 2001, 276:11615-11623
30. Yethon JA, Epand RF, Leber B, Epand RM, Andrews DW: Interaction with a membrane surface triggers a reversible conformational change in Bax normally associated with induction of apoptosis, *J Biol Chem* 2003, 278:48935-48941
31. Esposti MD, Dive C: Mitochondrial membrane permeabilisation by Bax/Bak, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003, 304:455-461

32. Roucou X, Montessuit S, Antonsson B, Martinou JC: Bax oligomerization in mitochondrial membranes requires tBid (caspase-8-cleaved Bid) and a mitochondrial protein, *Biochem J* 2002, 368:915-921
33. Cartron PF, Oliver L, Martin S, Moreau C, LeCabellec MT, Jezequel P, Meflah K, Vallette FM: The expression of a new variant of the pro-apoptotic molecule Bax, Baxpsi, is correlated with an increased survival of glioblastoma multiforme patients, *Hum Mol Genet* 2002, 11:675-687
34. Cartron PF, Gallenne T, Bougras G, Gautier F, Manero F, Vusio P, Meflah K, Vallette FM, Juin P: 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* 2004, 16:807-818
35. Juin P, Cartron PF, Vallette FM: Activation of Bax by BH3 domains during apoptosis, *Cell Cycle* 2005, 4:637-642
36. Desagher S, Osen-Sand A, Nichols A, Eskes R, Montessuit S, Lauper S, Maundrell K, Antonsson B, Martinou JC: Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis, *J Cell Biol* 1999, 144:891-901
37. Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC: Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane, *Mol Cell Biol* 2000, 20:929-935
38. Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ: Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics, *Cancer Cell* 2002, 2:183-192
39. Wang K, Yin XM, Chao DT, Milliman CL, Korsmeyer SJ: BID: a novel BH3 domain-only death agonist, *Genes Dev* 1996, 10:2859-2869
40. Terrones O, Antonsson B, Yamaguchi H, Wang HG, Liu J, Lee RM, Herrmann A, Basanez G: Lipidic pore formation by the concerted action of proapoptotic BAX and tBID, *J Biol Chem* 2004, 279:30081-30091
41. Cartron P-F, Moreau C, Oliver L, Mayat E, Meflah K, Vallette FM: Involvement of the N-terminus of Bax in its intracellular localization and function, *FEBS Letters* 2002, 512:95-100
42. Cartron PF, Gallenne T, Bougras G, Gautier F, Manero F, Vusio P, Khaled M, Vallette FM, Juin P: The first helix of Bax plays a necessary role in its ligand-induced activation by the BH3-only proteins BID and PUMA, *Mol Cell* 2004, 16:807-818
43. Sattler M, Liang H, Nettlesheim D, Meadows RP, Harlan JE, Eberstadt M, Yoon HS, Shuker SB, Chang BS, Minn AJ, Thompson CB, Fesik SW: Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis, *Science* 1997, 275:983-986
44. Sedlak TW, Oltvai ZN, Yang E, Wang K, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ: Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, 92:7834-7838
45. Zha H, Aime-Sempe C, Sato T, Reed JC: Proapoptotic protein Bax heterodimerizes with Bcl-2 and homodimerizes with Bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2, *J Biol Chem* 1996, 271:7440-7444
46. Zha H, Reed JC: Heterodimerization-independent functions of cell death regulatory proteins Bax and Bcl-2 in yeast and mammalian cells, *J Biol Chem* 1997, 272:31482-31488
47. Hirovani M, Zhang Y, Fujita N, Naito M, Tsuruo T: NH2-terminal BH4 domain of Bcl-2 is functional for heterodimerization with Bax and inhibition of apoptosis, *J Biol Chem* 1999, 274:20415-20420
48. Minn AJ, Kettlun CS, Liang H, Kelekar A, Heiden MG, Chang BS, Fesik SW, Fill M, Thompson CB: Bcl-xL regulates apoptosis by heterodimerization-dependent and -independent mechanisms *EMBO J.* 1999, 18:632-643
49. Dlugosz PJ, Billen LP, Annis MG, Zhu W, Zhang Z, Lin J, Leber B, Andrews DW: Bcl-2 changes conformation to inhibit Bax oligomerization, *Embo J* 2006, 25:2287-2296

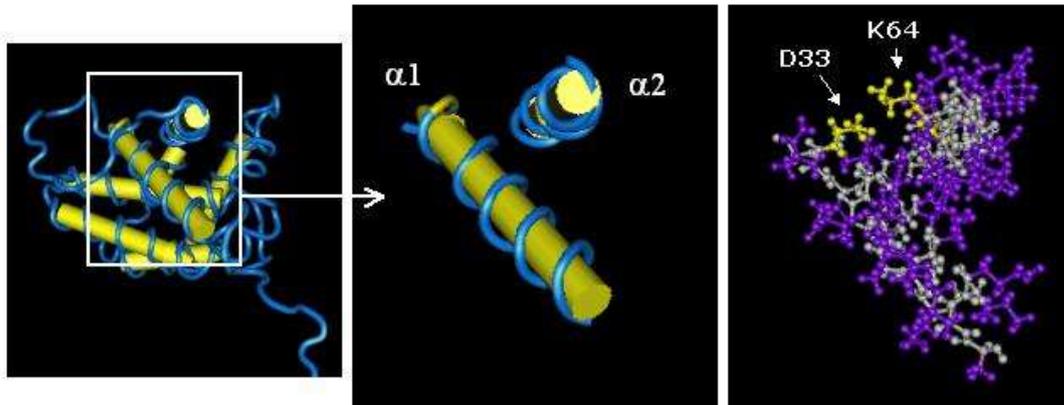
50. Jeong SY, Gaume B, Lee YJ, Hsu YT, Ryu SW, Yoon SH, Youle RJ: Bcl-x(L) sequesters its C-terminal membrane anchor in soluble, cytosolic homodimers, *Embo J* 2004, 23:2146-2155
51. Degterev A LA, Cardone M, Mulley B, Wagner G, Mitchison T, Yuan J.: Identification of small-molecule inhibitors of interaction between the BH3 domain and Bcl-xL., *Nat Cell Biol.* 2001, 3:173-182
52. Vieira HL, Boya P, Cohen I, El Hamel C, Haouzi D, Druillenec S, Belzacq AS, Brenner C, Roques B, Kroemer G: Cell permeable BH3-peptides overcome the cytoprotective effect of Bcl-2 and Bcl-X(L), *Oncogene* 2002, 21:1963-1977
53. Yin H, Lee GI, Sedey KA, Rodriguez JM, Wang HG, Sebti SM, Hamilton AD: Terephthalamide derivatives as mimetics of helical peptides: disruption of the Bcl-x(L)/Bak interaction, *J Am Chem Soc* 2005, 127:5463-5468
54. Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, Armstrong RC, Augeri DJ, Belli BA, Bruncko M, Deckwerth TL, Dinges J, Hajduk PJ, Joseph MK, Kitada S, Korsmeyer SJ, Kunzer AR, Letai A, Li C, Mitten MJ, Nettekheim DG, Ng S, Nimmer PM, O'Connor JM, Oleksijew A, Petros AM, Reed JC, Shen W, Tahir SK, Thompson CB, Tomaselli KJ, Wang B, Wendt MD, Zhang H, Fesik SW, Rosenberg SH: An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours, *Nature* 2005, 435:677-681
55. Degterev A, Lugovskoy A, Cardone M, Mulley B, Wagner G, Mitchison T, Yuan J: Identification of small-molecule inhibitors of interaction between the BH3 domain and Bcl-xL, *Nat Cell Biol* 2001, 3:173-182
56. D'Alessio M, De Nicola M, Coppola S, Gualandi G, Pugliese L, Cerella C, Cristofanon S, Civitareale P, Ciriolo MR, Bergamaschi A, Magrini A, Ghibelli L: Oxidative Bax dimerization promotes its translocation to mitochondria independently of apoptosis, *Faseb J* 2005, 19:1504-1506



**Figure 1:** The CLIC Bax closed-packed conformation, as described by Suzuki et al. <sup>4</sup>. The 9  $\alpha$  helices are represented in yellow. The mostly hydrophobic  $\alpha 5$  and  $\alpha 6$  helices are embedded in the core of the protein. The C-terminal H $\alpha 9$  is sequestered in the hydrophobic cleft, defined by the BH1, 2 and 3 domains, respectively overlapping the H $\alpha 4$ -H $\alpha 5$  junction, the  $\alpha 2$  helix and the  $\alpha 7$ - $\alpha 8$  helices.



**Figure 2:** Representation of the Bax CLIC/CLAC transition. 1) In Bax CLIC, the addressing sequence is hidden by the N- and the C- ART sequences; the N-ART domain can interact with inhibitory proteins and its position is controlled by the residues P8 and P13 which confer a rigid structure to the region. 2) tBid can disrupt the intramolecular bond between BaxD33 and BaxK64, thereby inducing the exposure of the mitochondrial addressing sequence. 3) Bax interacts with a protein receptor located at the outer mitochondrial membrane (OMM). 4) A rotation of the H $\alpha$ 9 around the P168 residue results in its liberation from the hydrophobic groove. This torsion of the protein induces the exposition of the  $\alpha$ 5- $\alpha$ 6 helices and of the BH3 domain. 5) The hydrophobic  $\alpha$ 5- $\alpha$ 6 helices insert into the OMM. The interaction with the mitochondrial receptor is disrupted. Bax association to the mitochondria becomes resistant to an alkaline treatment. 6) Bax CLAC homo-oligomerisation happens simultaneously to channel formation. The  $\alpha$ 9 helix insertion into the OMM participates to Bax oligomerisation and channel formation. Oligomerisation also implicates Bax BH3 domain, possibly through a H $\alpha$ 1-BH3 interaction.



**Figure 3:** Illustration of the electrostatic bond between the Bax H $\alpha$ 1 and BH3 domain. The 2 first helices of Bax are isolated (left and middle panels). The right panel shows the position of the D33 and K64 residues of Bax (gray: protein backbone; purple: accessory chains; yellow: D33 and K64). An electrostatic interaction between the negatively-charged D33 and the positively-charged K64 ensures the sequestration of the H $\alpha$ 1 near the BH3 domain.

## **Control of Bax homo-dimerization by its carboxy-terminal.**

**Emine Er<sup>1,2</sup>, Lisenn Lalier<sup>1,2</sup>, Pierre-François Cartron<sup>1,2</sup>, Lisa Oliver<sup>1,2</sup> and François M. Vallette<sup>1,2</sup>.**

From <sup>1</sup>INSERM U601, Département de Recherches en Cancérologie de Nantes, France and the <sup>2</sup>Université de Nantes, Faculté de Médecine, 9 Quai Moncousu F-44035 Nantes. Cedex 01 France.

**Running title:** Bax dimerization

**Address correspondence:** Dr François M. Vallette, UMR 601 INSERM/Université de Nantes, 9 Quai Moncousu 44035 CEDEX 01. France Tel: 33-240084081, fax: 33-240084082, e-mail: [francois.vallette@univ-nantes.fr](mailto:francois.vallette@univ-nantes.fr)

**Abbreviations:** H $\alpha$  alpha helix; AMOMP: apoptotic mitochondrial outer membrane permeabilization; Bax-CT: carboxy terminal of Bax (amino acids 170-191); FLBax: full length Bax  $\alpha$ ; GFP: Green Fluorescent Protein; IVT: *in vitro* translated; NT-Bax: amino terminal of Bax; pBcl-2s: proteins of the Bcl-2 family; RFP: Red Fluorescent Protein; rt-Bid: recombinant truncated (p13)-Bid.

[J Biol Chem.](#) 2007 Aug 24;282(34):24938-47. Epub 2007 Jun 7.

### **Control of Bax homodimerization by its carboxyl terminus.**

**[Er E](#), [Lalier L](#), [Cartron PF](#), [Oliver L](#), [Vallette FM](#).**

INSERM U601, Département de Recherches en Cancérologie de Nantes, Faculté de Médecine, 9 Quai Moncousu F-44035 Nantes, Cedex 01 France.

The regulated oligomerization of proteins is increasingly understood to be an important step in many cellular processes, including signaling, transcription, and protein degradation. The activity of Bax, which is essential for the completion of apoptosis, has been shown to be associated with its oligomerization: homodimerization that appears to facilitate mitochondrial permeabilization during apoptosis and heterodimerization with multidomain anti-apoptotic members of the Bcl-2 family inhibiting this process. Several domains have been identified to be crucial in the homo-/heterodimerization or oligomerization of Bax, especially the so-called Bax homology 3 domain. In this study we show that although the carboxyl terminus of Bax is not implicated in its mitochondrial localization, it has a role in the dimerization process and thus in its activity.

## Summary

**The regulated oligomerization of proteins is, increasingly understood to be, an important step in many cellular processes including signaling, transcription and protein degradation. The activity of Bax, which is essential for the completion of apoptosis has been shown to be associated with its oligomerization: homo-dimerization that appears to facilitate mitochondrial permeabilization during apoptosis and hetero-dimerization with multi-domain anti-apoptotic members of the Bcl-2 family inhibiting this process. Several domains have been identified to be crucial in the homo-/hetero-dimerization or oligomerization of Bax especially the so-called BH3 domain. In this study we show that the carboxyl-terminal of Bax is not implicated in its apoptotic activity or mitochondrial targeting but is essential for its dimerization process.**

## Introduction

Proteins of the Bcl-2 family (pBcl-2s) are essential for the implementation of the cell death program called apoptosis (1). This family is defined by structural and sequence homology of at least one domain. Typically anti-apoptotic members of this family (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W) comprise 4 domains of homology termed BH1-4 while pro-apoptotic members are limited to 3 domains BH1-3 (multi-domain proteins such as Bax and Bak) or only a BH3 (e.g. Bad or Bid) (1). The latter class is divided into two sub-groups: Bad-like that acts as inhibitors of anti-apoptotic members or Bid-like that act as activators of Bax (2). The BH3 domain is implicated in the homo- and hetero-dimerization of pBcl-2s, a process that is central to the control of mitochondrial permeability, which is essential for the completion of the apoptotic program (3). The apoptotic mitochondrial outer membrane permeabilization (AMOMP), which leads to the release of intermembrane mitochondrial proteins such as cytochrome c, smac/Diablo and AIF, is under the control of Bax and Bak (3). In healthy cells, Bax is a monomeric protein soluble in the cytosol or loosely attached to outer mitochondrial membrane. Upon the induction of apoptosis, Bax undergoes a change in the conformation resulting in the translocation to the mitochondria and the subsequent formation of oligomers, which are supposed to be involved in the formation of AMOMP via the formation of channels or pores (4). Thus, oligomerization appears to be essential to AMOMP but the precise molecular mechanism is not completely understood. Recent data from Annis *et al.* (5) suggest that membrane permeabilization occurs through the recruitment of monomers embedded in

the membrane and thus the assemblage of oligomers occurs within the mitochondrial member (or in close proximity) and not in the cytosolic compartment. It has been suggested that the last alpha helix of Bax (i.e. H $\alpha$ -9) was the addressing/membrane anchor domain of the protein based on its homology with equivalent domains in anti-apoptotic pBcl-2s (6). However, others and we have shown that this domain was essential for neither its mitochondrial addressing nor its pro-apoptotic activity in yeast and mammals (reviewed in 4). In addition, Bax lacking its H $\alpha$ -9 (Bax $\Delta$ C) appears to be more effective than full length Bax  $\alpha$  (FLBax) to form channels in the mitochondrial membrane (7). Structural analyses suggest that although the H $\alpha$ -9 of Bax is anchored in the membrane, its actual role is more complex than primarily assumed (4).

In this work, we have analyzed apoptosis induced by a Bax construct lacking the H $\alpha$ -9 (Bax $\Delta$ C). We show that Bax $\Delta$ C induced apoptosis in a cell line deficient in endogenous Bax as well as in a cell line expressing Bax. However, Bax $\Delta$ C appears to be a monomer both in the cytosol and in the mitochondria under healthy or apoptotic conditions suggesting that Bax $\Delta$ C cannot form oligomers with itself or with FLBax. We also show that substitution of H $\alpha$ -9 by the equivalent segment of Bcl-xL (Bax<sup>TMxL</sup>) restores this capacity to form oligomers. Thus, confirming that the carboxy-terminal of Bax (Bax-CT) is not involved in mitochondrial addressing but in oligomerization. Indeed, monomers of Bax $\Delta$ C are capable of inducing AMOMP with a similar efficiency as that observed with FLBax.

## ***Experimental procedures***

### **Materials**

Unless otherwise stated all reagents used in this study were from Sigma-Aldrich (St. Quentin, Fallavier, France). All cell culture material was obtained from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). Etoposide was from Teva® Classics (Paris, France) and was used from a stock solution at 20 mg/ml. Commercial antibodies used were monoclonal anti-Bax (clone: 2D2, R&D Systems, Lille, France), polyclonal anti-Bax (clone: A3533, DakoCytomation, Trappes, France), monoclonal anti-flag (F1804, Sigma), monoclonal anti-cytochrome c (MAB-897, R&D Systems), HRP-coupled secondary antibodies from Biorad (Ivry Sur Seine, France) and Alexa 568 and 488-conjugated secondary antibodies from Molecular Probes

(Invitrogen). The cross-linkers ethylene glycol bis[succinimidylsuccinate] (EGS) and disuccinimidyl suberate (DSS) were from Pierce (Perbio Science, Brebière, France).

### **Cell culture**

The human cell line HeLa was grown in complete RPMI (RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 2 mM glutamate). The human cell line Du145 (gift from Dr P.T Daniel, Max Delbruck Center for Molecular Medicine, Berlin-Buch, Germany) was grown in complete DMEM complete (DMEM medium 4500 mg/l glucose supplemented with 10% FBS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 2 mM glutamate). Cells were cultured at 37°C in an environment of 5% CO<sub>2</sub>-95% air in a humidified atmosphere. Apoptosis was induced in semi-confluent (50 to 70%) cultures and cell viability was determined by Trypan blue exclusion.

### **Plasmids construction**

The pRcCMV/FLBax, pRcCMV/BaxΔC and pRcCMV/BaxTMxL were as described in (8). GFP-FLBax and GFP-BaxΔC were obtained by site-directed mutagenesis using the PCR-based Gateway method then subcloned into a pcDNA-DEST53 plasmid according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Primers used were Bax-S (GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTA ATG GAC GGG TCC GGG GAG CAG CCC) and Bax-AS (GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC GCC CAT CTT CTT CCA GAT GGT G) (for Bax) or BaxΔC-AS (GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC CTG CCA CGT GGG CGT CCC AAAGTA G) (for BaxΔC).

Flag-FLBax and flag-BaxΔC were obtained using the Gateway method and were subcloned into a pDEST12.2 plasmid according to the manufacturer's instructions. Primers used were flag-sense (5' GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT AGA AGG AGA TAG AAC CAT GGA CTA CAA AGA CGA TGA CGA C 3'), Bax-antisense (5' GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC GCC CAT CTT CTT CCA GAT GGT GAG T 3') and BaxΔC-antisense (5' GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC CTG CCA CGT GGG CGT CCC AAA GTA G 3').

Flag-FLBax, cloned into pDEST12.2 was subjected to mutagenesis to obtain the L63E mutant using the site-directed mutagenesis system from Invitrogen with the oligonucleotide 5'-ACCAAGAAGCTGAGCGAGTGTGAGAAAGCGCATCGGGGAC-3' (the mutated

sequence is underlined). The construction of the H $\alpha$ 1-RFP and RFP-H $\alpha$ 9 plasmids was as described in (9).

### **Cell transfection**

The different cell lines were transfected with pRcCMV-FLBax, pRcCMV-Bax $\Delta$ C or pDEST12.2-flag-Bax $\Delta$ C using Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 (Invitrogen). Briefly, 10  $\mu$ g plasmid DNA diluted in 100  $\mu$ l Opti-MEM<sup>®</sup> medium was added to 25  $\mu$ l lipofectamine, gently mixed and incubate for 15 min at room temperature, then added directly to the cells at 50 to 70% confluency. Stable transfectants were selected with 250  $\mu$ g/ml G418. For HeLa cells transfected with (pcDNA-DEST53) GFP-Bax or (pcDNA-DEST53) GFP-Bax $\Delta$ C: 10  $\mu$ g plasmid DNA was introduced by electroporation (GenePulser, BioRad) using 200 V/cm and 250  $\mu$ F, transfected cells were selected in a medium containing 250  $\mu$ g/ml G418 over 72h.

### **Cell fractionation**

After the induction of apoptosis by UV-irradiation (1 min) or etoposide treatment, the cells were collected (16h, 24h or 36h after the treatment) and centrifuged at 1 000g for 10 min at 4°C. The cell pellets were washed twice with ice-cold PBS then resuspended in v/v CEB [250 mM sucrose; 50 mM HEPES pH 7.4, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dithiothreitol (DTT), 10 mM cytochalasin B, 1 mM EGTA and 1 tablet protease inhibitor] as previously described (1). Cells were allowed to swell for 30 min on ice then homogenized with 30 strokes in a 2 ml glass Dounce homogenizer. The homogenates were centrifuged at 750g for 10 min at 4°C and the resulting supernatants centrifuged a further 15 min at 15 000g at 4°C. The mitochondrial pellets (Mito) were resuspended in CEB. The supernatant was further centrifuged at 100 000g for 30 min in an airfuge (Beckman, USA) and the resulting supernatant (S100) was further referred as the cytosolic fraction.

### **Microinjection**

Microinjections were performed as previously described (11). Briefly, cells were seeded on glass coverslips the day prior to microinjection, which was performed using sterile microcapillaries (femtotips II, Eppendorf, Hamburg, Germany) mounted on an automated microinjection system. The plasmids (100 ng/ $\mu$ l) were co-injected with 100 ng/ $\mu$ l pDSRed2-C1 plasmid (Clontech, Ozyme, St Quentin Yvelines, France) marker. Typically, 100 to 200 cells were injected using an identical pressure (100 hPa) and time (0.1s). The percentage of positive cells (with red fluorescence) with apoptotic characteristics was evaluated every 2h.

For cytoplasmic microinjections, peptides and/or recombinant proteins were dissolved in PBS together with dextran (10 kDa)-conjugated lysine-fixable Oregon Green (0.5% final concentration; Molecular Probes) as a coinjection marker. Typically, 200 cells were microinjected for each condition in each experiment. Calibration assays indicated that a 2- to 5- $\mu$ l volume was delivered to each cell (data not shown). The percentage of positive (i.e., fluorescent) cells exhibiting morphological features of apoptosis was evaluated by fluorescence microscopy.

For nuclear microinjection studies, plasmid DNA was purified using Qiagen midipreps according to the manufacturer's instructions. 100 ng/ $\mu$ l empty expression vector pEGFP-N1, pEGFP-N1 (fl-Bax) or pEGFP-N1 (Bax $\Delta$ C) was microinjected.

The cells were microinjected with the same concentration of plasmid, confocal analyses using the same PMT confirmed that the relative fluorescence in the cells microinjected with fl-Bax and Bax $\Delta$ C was similar.

#### *Cross-linking experiments*

For cross-linking experiments with EGS or DSS, 50  $\mu$ g mitochondrial (Mito) and cytosolic fractions (S100) were incubated in the absence or in the presence of 2 mM EGS or DSS for 45 min at room temperature. The cross-linker DSS was added to IVT-Bax, Bax $\Delta$ C, H $\alpha$ 1-RFP and RFP-H $\alpha$ -9 at a final concentration of 5 mM at pH 7.8 to trigger dimerization (10). After incubation for 30 min at room temperature, the cross-linker was quenched with 25 mM Tris-HCl (pH 7.5). Bax oligomerization was analyzed in 12% SDS-PAGE, followed by Phosphorimager analysis. Western-blots

The protein concentration was determined in the different fractions using the Bio-Rad protein assay prior to analysis under reducing conditions in 12% SDS-PAGE. Western blots were performed using standard protocol. BM Chemiluminescence Blotting Substrate POD (Roche) was used to detect proteins bound to Immobilon-P (Millipore, St Quentin Yvelines, France).

#### **Laser confocal microscopy**

For confocal analysis, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde/0.9% picric acid in PBS for 30 min. After a 10 min permeabilization with 0.1% SDS/PBS and a saturation with 5% gelatin/PBS for 1h, the cells were incubated with polyclonal anti-F1-ATPase (1/1000; a gift from Prof. J. Lunardi) for 1h then washed and incubated overnight at 4°C with anti-Bax antibodies (2 $\mu$ g). After extensive washing, the cells were incubated with secondary antibodies

for 1h. All incubations were done at room temperature unless stated otherwise. Images were visualized using a Leica TCS NT microscope with a 63x 1.3 NA Fluotar objective (Leica, France). Quantification of the overlay of labeling was done using the Metamorph program (<http://www.image1.com/products/metamorph>). Briefly, the correlation coefficient ( $r$ ) is a measure of the strength of the relationship between two variables  $x$  (labeling specific for mitochondria) and  $y$  (labeling of Bax).

#### *Blue Native-PAGE*

Blue native PAGE (BN-PAGE) was performed essentially as described in <http://www.hos.ufl.edu/clineweb/Protocols/BNgel.htm>. Briefly, mitochondria were suspended at 0.8 mg/ml in imidazole/HCl buffer (pH 7.0) containing 50 mM NaCl and 5 mM  $\epsilon$ -aminocaproic acid. Digitonin-solubilization was done for 20 mins on ice at a detergent/protein ratio of 3 (w/w). Unsolubilized material was removed by centrifugation 21 000g for 20 mins. The supernatant was supplemented with Coomassie dye solution (5% Serva Blue G in 750 mM  $\epsilon$ -aminocaproic acid) at a dye/protein ratio of 0.2 (w/w) and separated on a linear gradient (5-14%) polyacrylamide slab gel. Molecular weight markers were treated in a similar manner before loading on the gel. Second dimension electrophoresis was done on each individual lane from the BN-PAGE. Lanes were excised and incubated in the dissociating solution (1% SDS, 1%  $\beta$ -mercaptoethanol) for 3h at room temperature. The lane was layered on the top of a 12.5% SDS-PAGE. The proteins were analyzed as described above.

#### **Quantification of immunoblots**

Bands were quantified using the Image J program at <http://rsb.info.nih.gov/ij/> *Induction of oligomerization*

<sup>35</sup>S-Met-proteins were synthesized from cDNAs using the TNT-coupled transcription/translation system from Promega (Lyon, France). The oligomerization of IVT-Bax, flag-Bax, Bax $\Delta$ C, flag-Bax  $\Delta$ C, Bax-L63E or BaxTMxL was induced by either recombinant t-Bid (11), increasing temperature from 30°C to 43°C for 1h (12) or changing the pH (10). rt-Bid was eliminated by Ni-NTA (Qiagen) as described in (11). Low-binding Ultracel-YM membrane from Millipore (France) with cut-off of 50 kDa (MicroCon YM 50) was used to isolate IVT-Bax monomers (21 kDa) or dimers (42 kDa), as recommended by the manufacturer. IVT-proteins incubated at various conditions (temperature, pH or tBid) were added to microCon YM 50 and were then eluted from the column and verified by SDS-PAGE and autoradiography as described in (10).

#### *Immunoprecipitation*

Immunoprecipitation experiments were performed using Catch & Release v2.0 (Chemicon, AbCys, Paris, France) under native condition with IVT-Bax or its mutants activated by 8 fmoles rt-Bid or by rising the temperature from 30°C to 43°C for 1h and with 4 µg anti-flag antibodies according to the manufacturer's instructions. Antibody-protein complexes were then incubated with gentle rocking for 30 min. The resin was collected by centrifugation for 30 sec at 2,000g. The supernatant was removed, and the pellet washed three times with 1x wash buffer. Elution was done with 1x non-denaturing elution buffer by centrifugation for 30 s at 2,000g. Controls immunoprecipitated (IP) were carried out in parallel with unrelated poly- or monoclonal antibodies. Immunoprecipitated proteins were analyzed by SDS-PAGE and scanned with a PhosphorImager (Molecular Dynamics).

#### *Bacterial Two-hybrid Assay*

The interaction between the different Bax domains was assayed using the Bacteriomatch™ two-hybrid system (Stratagene) as described earlier (13). This assay measured the interaction between polypeptides fused to the NT of RNA polymerase  $\alpha$  in a target plasmid (pTRG) and a sequence fused to the bacteriophage  $\lambda$ cl protein in a bait plasmid (pBT). The interaction between the proteins ensured the survival of bacteria in a selective media as described in (13). The oligomerization of Bax was screened using as a bait the plasmids encoding for Bax (pBT-Bax), H $\alpha$ -1-RFP (pBT-H $\alpha$ -1-RFP), H $\alpha$ -9-RFP (pBT-H $\alpha$ -9-RFP) and BH3-RFP (pBT-BH3-RFP), whereas the target plasmids encoded for the H $\alpha$ -9-RFP (pTRG-RFP-H $\alpha$ -9) and the BH3- RFP (pTRG-BH3-RFP). Bacteria transformation, growth, and selection were performed according to the manufacturer's instructions ([www.stgn.com/manuals/982000.pdf](http://www.stgn.com/manuals/982000.pdf)).

## **Results**

*A deletion of the Bax-CT does not interfere with its intracellular localization and its apoptotic function but with its oligomerization in a Bax-deficient cell line.*

Others and we have shown that the Bax-CT was not essential for its sub-cellular localization or its apoptotic function in several cell lines (8,9,14-16). A prostate carcinoma cell line (Du145, which does not express Bax) was transfected with a human Bax construct in which the last 21 amino acids (i.e. a.a. 170-191) were deleted and a flag-tag added to the N-terminal (flag-Bax $\Delta$ C). The sub-cellular localization and apoptotic activity of this construct was compared to that of full length Bax (i.e. FLBax). It should be noted that we were not able

to obtain a stable transfected cell line exhibiting a high expression of Bax $\Delta$ C as the over-expression of this construct appeared highly toxic for these cells (**data not shown**). As demonstrated in **figure 1A**, the cell lines used exhibited a two-fold difference between FLBax and flag-Bax $\Delta$ C variants. Interestingly, despite this difference in expression, the viability of cells was more affected in the Bax $\Delta$ C expressing cells (**figure 1B**), suggesting again that the construct was more toxic than its wild type counterpart. We have recently described several cell lines derived from human gliomas, which do not express Bax (Bax $-$ /Bak $+$  GBM) or Bax and Bak (Bax $-$ /Bak $-$  GBM) (11). We expressed the Bax $\Delta$ C construct in these cell lines to study the influence of endogenous Bak on Bax $\Delta$ C activity. Apoptosis was induced either by UV or by staurosporine (STS) treatments (see experimental procedures) in transfected cells, which expressed similar amounts of Bax $\Delta$ C (**data not shown**). Cell death was monitored by either Trypan blue exclusion or DEVDase activity as described earlier (11). No or little cell death was observed in these cells in absence of apoptotic stimuli while, on the other hand, similar cell death levels were observed in these cell lines indicating that the presence of Bak did not affect the activity of Bax $\Delta$ C (**fig. 1C**).

One of the hallmarks of apoptosis is the release of cytochrome c from the mitochondria to the cytosol due to an apoptosis-induced mitochondrial permeabilization, which is mostly due to Bax translocation to mitochondria (17). To determine whether the release of cytochrome c was associated with a Bax translocation to mitochondria the sub-cellular localization of Bax and Bax $\Delta$ C in untreated and etoposide-treated cells was analyzed by laser confocal microscopy. As shown in **figure 2A**, a proportion of Bax and Bax $\Delta$ C was mitochondrial (i.e. co-localized with F1-ATPase) in untreated cells and this proportion was significantly increased in both cases after the induction of apoptosis by the DNA damaging agent, etoposide. Similar results were obtained using another apoptosis inducer (i.e. UV-B treatment) (**data not shown**). To verify that the cytochrome c release was associated with Bax (and in particular that of flag-Bax $\Delta$ C) translocation to mitochondria, its presence in the cytosol was assessed after cell fractionation as described earlier (9) in both FLBax and flag-Bax $\Delta$ C expressing Du145 cells. As shown in **figure 2B**, induction of apoptosis by etoposide stimulated the liberation of cytochrome c in both FLBax and Bax $\Delta$ C transfected Du145 cells although in the latter case this release was not complete. The extent of the release of cytochrome c has been correlated with the degree of oligomerization of Bax (18-20). Thus, we examined the molecular organization of Bax and Bax $\Delta$ C after the induction of apoptosis by UV-B or etoposide. **Figure 2C** shows the results obtained in UV-B-treated cells (note that

similar results were obtained with etoposide). Quite surprisingly, we observed that the oligomerization of Bax was incomplete in mitochondria from FLBax transfected Du145 cells in which, only dimers were found, and completely absent in Bax $\Delta$ C transfected Du145 cells in which, only monomers were observed.

These results suggest that the oligomerization of Bax is affected in Du145 cell lines and this is particularly significant in the case of Bax $\Delta$ C as this variant is present only as monomers. It has been suggested that c-myc was involved in Bax activation at the mitochondrial level and in particular, in promoting the oligomerization (5,21). However, it has been reported that Du145 cells express a functional c-myc (22), ruling out the involvement of this oncogene as a putative factor involved in the deficient oligomerization.

*The oligomerization of Bax $\Delta$ C is also deficient in Bax expressing HeLa cells.*

It could be possible that the lack of endogenous FLBax was responsible for the absence of oligomerization observed above. To address this question, we used HeLa cells, which express FLBax. To discriminate the exogenous from endogenous Bax, a green fluorescent protein (GFP) or a flag-tag was fused to the N-terminus of FLBax or Bax $\Delta$ C (see the Experimental procedures). As shown in **figure 3A** the expression of Bax in HeLa cells was similar in GFP-Bax and GFP-Bax $\Delta$ C cells. However, we were able to obtain only a weak expression of the flag-Bax $\Delta$ C construct (**figure 3A**). Nonetheless, the expression of Bax $\Delta$ C constructs induced a rapid response to apoptosis when compared to their wild type counterparts (**figure 3B**). We could not obtain viable cells expressing flag-FLBax (data not shown), probably because the addition of the flag-tag to NT-Bax provoked a change in conformation that enhanced its apoptogenic properties (8,16). On the other hand, we were able to obtain a stable expression of Bax constructs in which GFP was fused to the N-terminal of FLBax and Bax $\Delta$ C. The subcellular localization of the resulting constructs (i.e. GFP-FLBax and GFP-Bax $\Delta$ C) was assessed by laser confocal microscopy in HeLa cells. As shown in **figure 3C**, both constructs were found mostly mitochondrial, a result different from previous reports (23) but similar to that obtained in HL60 cell line (8). In parallel, we analyzed the cross-linked products of untagged FLBax and Bax $\Delta$ C or flag-Bax $\Delta$ C in HeLa cells in the cytosolic and mitochondrial fractions of untreated and apoptotic cells (see Experimental procedures). As shown in **figure 4A**, an analysis of the cross-linked products of untagged Bax in apoptotic (i.e. UV-B-treated) or healthy (i.e. untreated) samples showed that both constructs were present as monomers in the cytosols of healthy and apoptotic cells. FLBax oligomers (dimers and possibly trimers) were formed during apoptosis in non-

transfected or in FLBax-transfected mitochondrial fractions. However, under similar conditions, Bax $\Delta$ C appeared monomeric as no oligomers of high molecular weight corresponding to FL-Bax-Bax $\Delta$ C or Bax $\Delta$ C-Bax $\Delta$ C dimers were found in the mitochondrial fractions from apoptotic cells (**figure 4A**). These results were confirmed in flag-Bax $\Delta$ C transfected cells after immunodetection of Bax $\Delta$ C cross-linked products using an anti-flag antibody (**figure 4B**).

Blue-native (BN)-PAGE allows the analysis of protein complexes by separating complexes essentially according to their size (24). BN-PAGE was used to examine the oligomerization status of FLBax and Bax $\Delta$ C in mitochondria isolated from HeLa cells. As shown in **figure 4C**, Bax was present mainly as a low molecular weight complex (i.e. 21 kDa) in both fractions in healthy cells and the molecular weight of the complexes increased during apoptosis. However, in both healthy and apoptotic cells, flag-Bax $\Delta$ C, detected with an anti-flag antibody, presented a molecular organization consistent with a monomeric structure, although two spots were observed (**figure 4C**). Taken together, our results suggest that Bax $\Delta$ C resides in mitochondria as monomers during apoptosis despite the presence of endogenous Bax in HeLa cells.

### ***Bid- or temperature-induced oligomerization of Bax is abolished in Bax $\Delta$ C construct.***

We assayed the influence of the oligomerization of Bax in an acellular assay as described earlier (11). Briefly, *in vitro* translated (IVT)-Bax constructs labeled with <sup>35</sup>S-methionine were activated by either raising the temperature or co-incubation with 8 fmol recombinant truncated (rt)-Bid. After the removal of rt-Bid, the presence of monomers or dimers of the various IVT-Bax constructs were determined under native or denaturing PAGE conditions. The incubation of FLBax or flag-FLBax with rt-Bid or at 43°C induced the formation of dimers while under similar conditions, Bax $\Delta$ C or flag-Bax $\Delta$ C remained monomeric (**figure 5A**). As expected, similar results were obtained with a Bax variant with a mutation in the BH3 domain (i.e. L63E), which has been shown to prevent oligomerization (25) (**figure 5A**). Interestingly, the Bax<sup>TMxL</sup>, a construct in which the Bax-CT was replaced by its equivalent Bcl-xL segment, underwent a dimerization process when treated by a change in temperature (43°C) or the addition of rt-Bid. It should be added that Bax<sup>TMxL</sup> has been shown to associate with mitochondria *in vitro* but was incapable of inducing apoptosis after transfection into HL60 cells or in yeast (26). These results suggest that the oligomerization of

Bax can be triggered by another hydrophobic C-terminal and that this oligomerization is not a prerequisite for its apoptotic function.

We co-incubated IVT-Bax and unlabeled flag-Bax at 30°C, 43°C or with rt-Bid then the mixture was immunoprecipitated with anti-flag antibodies and analyzed under non-denaturing conditions. As shown in **figure 5B**, IVT-Bax co-immunoprecipitated with anti-flag antibodies after an incubation at 43°C or after activation with rt-Bid indicated that FLBax and flag-FLBax formed dimers under these conditions. Similar results were obtained after incubation of IVT-flag-FLBax and FLBax. Inversely, after co-incubation of IVT-flag-Bax $\Delta$ C and Bax $\Delta$ C (or vice versa) immunoprecipitation with anti-flag antibodies demonstrated that Bax $\Delta$ C could not self-associate under the same conditions (**figure 5B**).

*The Bax-CT is not a dimerization domain.*

Our results show that a deletion of Bax-CT interfered with Bax dimerization *in vitro* and in an acellular assay. One possibility is that H $\tilde{\alpha}$ 9 could dimerize with the equivalent segment in another Bax molecule or with the BH3 domain. To test this hypothesis, we analyzed the capacity of H $\tilde{\alpha}$ 9 to form a stable complex with itself or with Bax BH3 using a double hybrid assay in bacteria (see Experimental procedures). We used a construct in which Bax H $\tilde{\alpha}$ 9 was fused to the C-terminal end of the red fluorescent protein (RFP). As shown in **figure 6A**, the RFP-H $\tilde{\alpha}$ 9 constructs were used as bait and did not interact with any of the constructs tested. As a control, we used a Bax BH3 domain fused to RFP as it forms a stable complex with itself under these conditions (**figure 6A**). In parallel, we analyzed the cross-linked products formed upon the incubation of FLBax, Bax $\Delta$ C and RFP-H $\alpha$ -9 constructs at pH 7.8, which is known to induce dimerization (10). As shown in **figure 6B**, the incubation of IVT FLBax at pH 7.8 induced its dimerization as assessed by cross-linking of the IVT construct while it remained monomeric at pH 7.4. Conversely, under the same conditions, no dimers were observed with RFP-H $\tilde{\alpha}$ 9 or Bax $\Delta$ C (**figure 6B**). In addition, cytosolic Bax $\Delta$ C obtained from Du145 transfected cells was treated with Triton X-100 under conditions, which promote the dimerization of Bax (27). **Figure 6C** shows that detergent-treated Bax $\Delta$ C was still capable of forming dimers suggesting that the H $\alpha$ -9 only indirectly controls the dimerization process of Bax and that it is neither sufficient nor necessary for this process.

## Discussion

Inactive cytosolic Bax appears to be a globular monomeric protein in which the C-terminal is closely associated with a hydrophobic pocket formed in part by the putative pore forming H $\alpha$ -5 and H $\alpha$ -6 (28). Once activated at the onset of apoptosis, Bax undergoes major conformational changes, which promotes the addressing of Bax to mitochondria and its insertion into the outer membrane of the organelle (4). Bax membrane integration is followed or closely associated with its oligomerization and AMOMP. The involvement of the C-terminal in these processes has been controversial but even if this segment is dispensable for the addressing and the integration of Bax into mitochondria, H $\alpha$ -9 appears to be membrane anchored in Bax activated conformers (6). Of note the latter step appears to be necessary for AMOMP and to require c-myc expression (5).

The data presented here shows that the Bax-CT was involved in the oligomerization step but that monomers formed by Bax $\Delta$ C are still capable of inducing AMOMP and cell death. Indeed, the expression of Bax $\Delta$ C in Du145 is capable of inducing apoptosis and promoting cytochrome c release from mitochondria (**figure 1**), even though it is present as monomers in the mitochondria isolated from dying cells while FLBax formed mainly dimers (**figure 2**). This result suggests that Bax-CT could be important for the formation of oligomers. The ability of flag-Bax $\Delta$ C to oligomerize with endogenous FLBax was assessed in HeLa cells (**figure 3**). Bax $\Delta$ C translocation to mitochondria was observed using a GFP-Bax $\Delta$ C construct. Indeed, contrary to previous reports, our GFP-Bax $\Delta$ C construct translocated to mitochondria after the induction of apoptosis. The oligomerization of Bax $\Delta$ C and flag-Bax $\Delta$ C in HeLa cells was first analyzed by cross-linking cytosolic and mitochondrial proteins in both healthy and apoptotic cells and then secondly, by evaluating the molecular complexes formed by Bax in BN-PAGE and SDS-PAGE followed by immunodetection (**figure 4**). The data obtained showed that Bax $\Delta$ C could not form oligomers with itself or with endogenous FLBax. We also used a cell free assay in which the different Bax constructs, activated either with rt-Bid or by a rise in temperature were incubated and the resulting complexes analyzed in BN-PAGE (**figure 5**). FLBax were capable of forming dimers under these conditions while Bax $\Delta$ C was present only as monomers. A similar result was obtained with the FLBax-L63E construct, which has been shown to be unable to homodimerize *in vitro*. Interestingly, the substitution of Bax H $\alpha$ -9 by Bcl-xL H $\alpha$ -8, which is involved in the association of Bcl-xL with mitochondria during apoptosis, restored the capacity of Bax $\Delta$ C to homodimerize (**figure 5**). Interestingly, the co-incubation of Bax $\Delta$ C with FLBax did not lead to the formation of heterodimers,

suggesting that the presence of a C-terminal in both partners was required (**figure 5**). One possibility implied by the latter results was that dimerization occurred directly through the C-terminal as described in several other membrane proteins. This hypothesis was analyzed in the double hybrid assay in bacteria or by cross-linking, then determining the interaction between different H $\alpha$ -9 constructs. As shown in **figure 6**, the presence of Bax H $\alpha$ -9 did not induce the oligomerization of soluble RFP ruling out the involvement of a direct interaction of this H $\alpha$  in Bax oligomerization. Exposure of FLBax to detergent induces the irreversible formation of high order oligomers. Of note, detergent treated Bax $\Delta$ C formed dimers demonstrating that it is not absolutely required in the formation of dimers (**figure 6**).

Taken together, our results suggest that the presence of Bax-CT is required for the formation of dimers and large oligomers *in vitro*. However, its role does not appear to be a structural prerequisite since Bax $\Delta$ C can undergo detergent induced dimerization and H $\alpha$ -9 can dimerize with itself. The fact that Bax $\Delta$ C as monomers can induce AMOMP is puzzling as most biophysical studies suggest that only oligomers can exhibit pore forming activity. However, it should be noted that it has been shown that Bax homodimerization was not required to enhance cell death (29) and that in an *in vivo* model of apoptosis cytochrome c was released in absence of high molecular weight Bax oligomers (30). Perhaps it is possible that Bax $\Delta$ C oligomers are not stable and as such, cannot be observed under our experimental conditions. One can postulate that Bax-CT could be involved in an irreversible phase by inhibiting the dissociation into smaller structures.

Of note, it has shown that the C-terminal of the anti-apoptotic protein Bcl-xL is involved in its oligomerization through an interaction with the BH3 domain (31,32). Interestingly, Bcl-xL constructs, which lack the last 22 amino acids in the C-terminal are predominantly present as monomers but are still capable of forming dimers at basic pH through a three dimensional domain swapping (33). We have previously reported that Bax H $\alpha$ -1 interferes with its BH3 domain (34) but it is possible that the formation of Bax dimers though the BH3 domain is under the tight control of its C-terminal. Our results also provide an explanation for the divergent data published on the role of C-terminal as it is possible that in some cell lines or under certain apoptotic conditions the formation of oligomers is required for Bax membrane integration and/or induction of AMOMP and thus Bax $\Delta$ C would be inactive under these circumstances.

**Acknowledgments:** This work was supported by grants from “Ligue Nationale contre le Cancer” (LNC, programme équipe labellisée), the “Institut National de la Santé et de la

Recherche Médicale” (INSERM) and the “Agence Nationale de la Recherche” (ANR, project MABA).

## References

1. Cory, S., and Adams, J. M. (2002) *Nat Rev Cancer* **2**(9), 647-656
2. Willis, S. N., and Adams, J. M. (2005) *Current Opinion in Cell Biology* **17**(6), 617-625
3. Scorrano, L., and Korsmeyer, S. J. (2003) *Biochem Biophys Res Commun* **304**(3), 437-444
4. Er, E., Oliver, L., Cartron, P.-F., Juin, P., Manon, S., and Vallette, F. M. (2006) *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1757**, 1301-1311
5. Annis, M., Soucie, E., Dlugosz, P., Cruz-Aguado, J., Penn, L., Leber, B., and Andrews, D. (2005) *EMBO J.* **24** (12), 2096-103.
6. Schinzel, A., Kaufmann, T., and Borner, C. (2004) *Biochim Biophys Acta* **1644**(2-3), 95-105
7. Schendel SL, M. M., Reed JC. (1998) *Cell Death Differ.* **5**(5), 372-380.
8. Tremblais, K., Oliver, L., Juin, P., Le Cabellec, T. M., Meflah, K., and Vallette, F. M. (1999) *Biochem Biophys Res Commun* **260**(3), 582-591
9. Cartron, P.-F., Priault, M., Oliver, L., Meflah, K., Manon, S., and Vallette, F. M. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**(13), 11633-11641
10. Cartron, P. F., Oliver, L., Mayat, E., Meflah, K., and Vallette, F. M. (2004) *FEBS Lett* **578**, 41-46
11. Cartron, P. F., Juin, P., Oliver, L., Martin, S., Meflah, K., and Vallette, F. M. (2003) *Mol Cell Biol* **23**(13), 4701-4712
12. Pagliari, L. J., Kuwana, T., Bonzon, C., Newmeyer, D. D., Tu, S., Beere, H. M., Green, D. R., and (2005) *PNAS* **102**, 17975-17980
13. Cartron, P. F., Gallenne, T., Bougras, G., Gautier, F., Manero, F., Vusio, P., Khaled, M., Vallette, F. M., and Juin, P. (2004) *Mol Cell* **16**, 807-818
14. John, G. B., Anjum, R., Khar, A., and Nagaraj, R. (2002) *Experimental Cell Research* **278**(2), 198-208
15. Zha, H., Fisk, H. A., Yaffe, M. P., Mahajan, N., Herman, B., and Reed, J. C. (1996) *Mol Cell Biol* **16**(11), 6494-6508
16. Priault, M., Cartron, P. F., Camougrand, N., Antonsson, B., Vallette, F. M., and Manon, S. (2003) *Cell Death Differ* **10**(9), 1068-1077
17. Adams, J. M. (2003) *Genes Dev.* **17**(20), 2481-2495
18. Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B., and Martinou, J. C. (2000) *Mol Cell Biol* **20**(3), 929-935
19. Antonsson, B., Montessuit, S., Lauper, S., Eskes, R., and Martinou, J. C. (2000) *Biochem J* **345 Pt 2**, 271-278
20. Roucou, X., Montessuit, S., Antonsson, B., and Martinou, J. C. (2002) *Biochem J* **368**(Pt 3), 915-921
21. Soucie, E. L., Annis, Matthew G., Sedivy, John, Filmus, Jorge, Leber, Brian, Andrews, David W., Penn, Linda Z. (2001) *Mol. Cell. Biol.* ( 21), 4725-4736
22. Cassinelli, G., Supino, R., Zuco, V., Lanzi, C., Scovassi, A. I., Semple, S. C., and Zunino, F. (2004) *Biochemical Pharmacology* **68**(5), 923-931
23. Nechushtan, A., Smith, C. L., Hsu, Y. T., and Youle, R. J. (1999) *Embo J* **18**(9), 2330-2341

24. Frank, K. (2006) *ELECTROPHORESIS* **27**(13), 2759-2781
25. Wang, K., Gross, A., Waksman, G., and Korsmeyer, S. J. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**(10), 6083-6089
26. Oliver, L., Priault, M., Tremblais, K., LeCabellec, M., Meflah, K., Manon, S., and Vallette, F. M. (2000) *FEBS Lett* **487**(2), 161-165
27. Hsu, Y. T., and Youle, R. J. (1997) *J Biol Chem* **272**(21), 13829-13834
28. Suzuki, M., Youle, R. J., and Tjandra, N. (2000) *Cell* **103**(4), 645-654
29. Simonian, P. L., Grillot, D. A. M., Andrews, D. W., Leber, B., and Nunez, G. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**(50), 32073-32077
30. Guihard, G., Bellot, G., Moreau, C., Pradal, G., Ferry, N., Thomy, R., Fichet, P., Meflah, K., and Vallette, F. M. (2004) *J Biol Chem* **279**(45), 46542-46550
31. Basanez, G., Zhang, J., Chau, B. N., Maksaeov, G. I., Frolov, V. A., Brandt, T. A., Burch, J., Hardwick, J. M., and Zimmerberg, J. (2001) *J Biol Chem* **276**(33), 31083-31091
32. Jeong, S. Y., Gaume, B., Lee, Y. J., Hsu, Y. T., Ryu, S. W., Yoon, S. H., and Youle, R. J. (2004) *Embo J* **23**(10), 2146-2155
33. O'Neill, J. W., Manion, M. K., Maguire, B., and Hockenbery, D. M. (2006) *Journal of Mol. Biol.* **356**(2), 367-381
34. Cartron, P.-F., Arokium, H., Oliver, L., Meflah, K., Manon, S., and Vallette, F. M. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**(11), 10587-10598

## Legends of the figures

**Figure 1:** **A)** Du145 cell line was transfected either with the empty vector (mock), FLBax or with flag-Bax $\Delta$ C. The expression of Bax was analyzed by immunoblots with either anti-Bax antibody (2D2) or anti-flag antibody. The expression of FLBax and flag-Bax $\Delta$ C was quantified (histogram) as described in experimental procedures. Immunoblot is representative of at least 3 independent experiments. **B)** Apoptosis was induced by micro-injection of HeLa cells with either the empty pRcCMV (con), pRcCMV-FLBax or pRcCMV-Bax $\Delta$ C and cell viability was determined by counting the remaining red cells. The data presented are the results after 16h of incubation and are the mean of at least 3 independent experiments. **C)** Bax $^{-}$ /Bak $^{+}$  GBM and Bax $^{-}$ /Bak $^{-}$  GBM cells were transfected with Bax $\Delta$ C and apoptosis was induced by UV-B and STS as described in experimental procedures. Cell death was determined by monitoring DEVDase activities and Trypan blue exclusion as described in **fig. 1B**. The data presented are the results after 16h of incubation and are the mean of at least 3 independent experiments.

**Figure 2:** **A)** Laser confocal microscopy analyses of the subcellular localization of FLBax and flag-Bax $\Delta$ C in resting (con) and etoposide-treated (apop) Du145 cells. The colocalization of the different proteins with the mitochondrial protein (F<sub>1</sub>-ATPase) was assessed using the Metamorph program (see Experimental procedures). As indicated on the histogram, both proteins were located in the cytosolic

and in the mitochondrial fractions in resting cells and the induction of apoptosis triggered a significant translocation toward the mitochondria in both cases. Data obtained from 200 different cells in at least 5 independent fields. **B)** The presence of cytochrome c was determined in the cytosolic and in the mitochondrial fractions of FLBax or flag-Bax $\Delta$ C transfected Du145 cells subjected or not to UV for 1 min then cultured for a further 36h. As shown in the illustrated experiment, cytochrome c was predominantly mitochondrial in untreated cells while in apoptotic cells most of the cytochrome c was present in the cytosol (see Experimental procedures). **C)** Analysis of the oligomerization of Bax by cross-linking in mitochondria isolated from flag-Bax $\Delta$ C- and FLBax-expressing Du145 cells. Mitochondria isolated from apoptotic (UV 1 min) or control (untreated) cells were incubated with the different cross-linkers (DSS and EGS), using DMSO as a control. Complexes of Bax were then analyzed in 12% SDS-PAGE and immunoblotting. Monomeric Bax was assumed to migrate with an apparent molecular weight of 21 kDa, and dimeric Bax at 42 kDa while Bax oligomers of higher order at molecular weight  $\geq 60$  kDa. The immunoblots were reprobated with an antibody directed against the mitochondrial protein TOM22 to control that equal quantities of mitochondrial protein were loaded in all lanes (not shown). Immunoblots are representative of at least 3 independent experiments.

Figure 3: **A) HeLa cells were transfected with GFP-Bax, GFP-Bax $\Delta$ C, FLBax or flag-Bax $\Delta$ C and the presence of the constructs analyzed and quantified as described in Experimental procedures. B) Influence of these constructs on the viability of the cells after a brief UV treatment (see Experimental procedures) was analyzed using Trypan blue exclusion. The data presented are the results after 36h incubation and are the mean of at least 3 independent experiments. C) Laser confocal microscopy analyses of**

the subcellular localization of GFP-FLBax and GFP-Bax $\Delta$ C in transfected HeLa (see Experimental procedures). The localization of the different proteins was assessed using with the mitochondrial protein F<sub>1</sub>-ATPase as control. Pictures show that both GFP constructs are localized to the mitochondria. Pictures are illustrative of at least 3 independent experiments.

**Figure 4:** **A)** HeLa cells were transfected with Bax $\Delta$ C and the efficiency of the transfection analyzed by immunoblots with anti-Bax and anti-actin antibodies (left panel). Analysis of the oligomerization of Bax in the cytosol and in the mitochondria isolated from control and Bax $\Delta$ C-transfected apoptotic cells was performed using different cross-linkers (DSS and EGS) and DMSO as a control. Bax complexes were analyzed by 12% SDS-PAGE and immunoblotting. The blots were washed and reprobed with an antibody against the mitochondrial protein TOM22 to control that equal amounts of mitochondrial protein were loaded in all lanes (not shown). Immunoblots are representative of at least 3 independent experiments. **B)** The oligomerization of flag-Bax $\Delta$ C was determined in the cytosol and in the mitochondria of UV-treated and untreated Du145 transfected cells by cross-linking followed by immunoblotting using an anti-flag antibody. Note that flag-Bax $\Delta$ C formed no complexes in mitochondria after an UV-treatment. **C)** BN-PAGE and immunoblotting analyses Bax complexes present in mitochondria isolated from HeLa cells transfected with empty plasmid (mock) or FLBax in untreated (con) and UV-treated (apop) cells. For flag-Bax $\Delta$ C, an anti-flag antibody was used. Immunoblots are representative of at least 3 independent experiments.

**Figure 5: A)** Different Bax constructs at a concentration of 8 fmol were incubated at 30° or 43°C or in the presence of 8 fmol rt-Bid then dimerization was analyzed in 12% SDS-PAGE as described in Experimental procedures. Monomers (M) and dimers (D) were defined by the apparent molecular (i.e. 21 kDa or 42 kDa). Illustrated experiments are representative of at least 3 independent experiments. **B)** Either IVT-FLBax was incubated with flag-FLBax (top left) or IVT-flag-FLBax was incubated with FLBax (right top) at different temperatures (30° and 43°C) or in the presence of BSA (-) or rt-Bid (t-Bid). The presence and the dimerization status of the flag-tagged construct were assessed after immunoprecipitation with anti-flag antibody and non-denaturing PAGE and phosphorImager analyses. Alternatively, IVT-Bax $\Delta$ C was incubated with flag-FLBax (bottom left) or IVT-flag-Bax $\Delta$ C was incubated with FLBax (bottom right) under similar conditions as above. Note that the addition of the flag-tag did not interfere with the oligomerization of flag-FLBax with FLBax but that under no circumstances dimerization of IVT-Bax $\Delta$ C or IVT-flag-Bax $\Delta$ C was observed. Illustrated experiments are representative of at least 3 independent experiments.

**Figure 6: A)** A double hybrid assay in bacteria was performed as described in Experimental procedures to test the capacity of Bax H $\alpha$ -9 to interact with itself. We used as a control the interaction of Bax BH3 domains with itself or with Bax H $\alpha$ -1 (32). **B)** IVT-Bax constructs (FLBax, Bax $\Delta$ C and RFP-H $\alpha$ -9) were incubated at neutral (pH 7.4) or basic pH (pH 7.8), a condition under which both Bax (10) and Bcl-xL (31) oligomerization was triggered. The formation of dimers at basic pH was analyzed in the presence of the cross-linker DSS and analysed by SDS-PAGE and autoradiography. **C)** Bax $\Delta$ C present in the cytosol of transfected Du145 cells were incubated in the presence of Triton X-100 and the formation of dimers analyzed in

12% SDS-PAGE and immunoblot with anti-Bax antibodies (see experimental procedures).

Supplementary data

**Figure S1:**

Du145 cells transfected with FLBax or Bax $\Delta$ C were cultivated in the presence of STS as described in experimental procedures. Time-lapse video-microscopy experiments were performed using a Zeiss Axiovert 200-M inverted microscope, according to the manufacturer's protocol. 24-well plates were placed inside an Incubator XL-3, on a heating insert M06 (37°C) topped with a CO<sub>2</sub>-cover HM connected to a CO<sub>2</sub> controller that maintained environmental CO<sub>2</sub> concentration at 5% for the duration of filming. Digital pictures were acquired and saved every 10 minutes over 48h using an AxioCam MRm digital camera and the AxioVision software, applying a 10x magnification. Applying the AxioVision conversion module, the series of photographs were displayed as continuous time-lapse movies prior to analysis.

S1A: DU 145 FL Bax untreated cells

S1B: DU 145 FL Bax STS treated cells

S1C: DU145 Bax $\Delta$ C untreated cells

S1D: DU 145 Bax $\Delta$ C STS treated cells

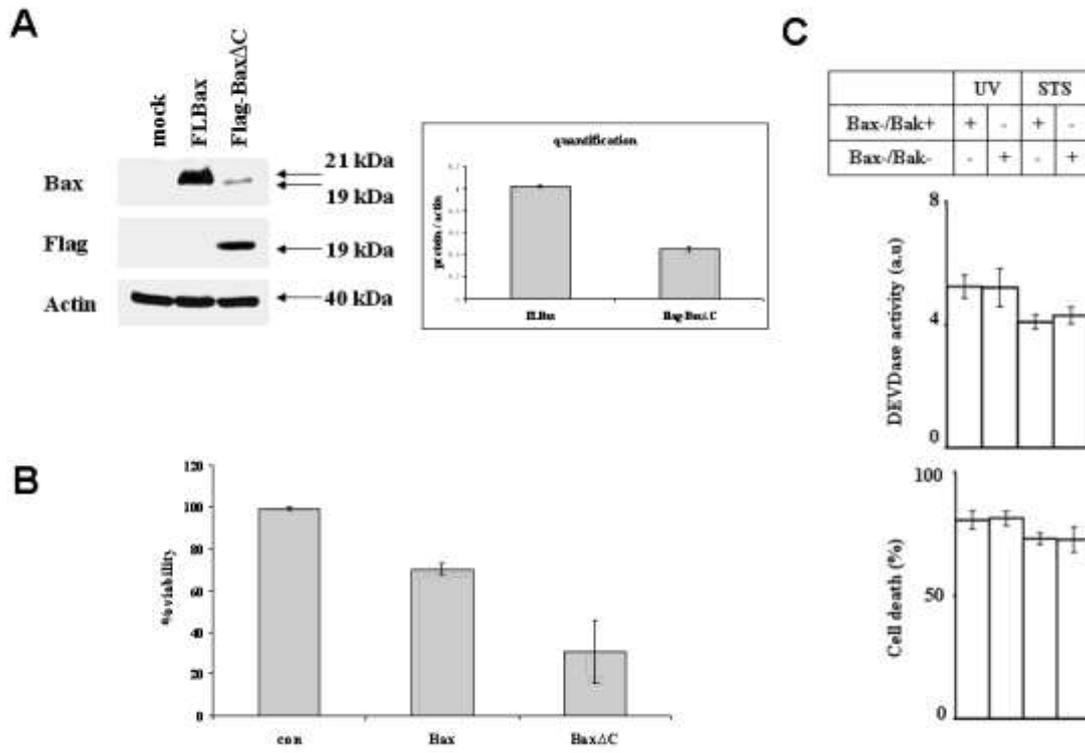


Figure 1: Er et al.

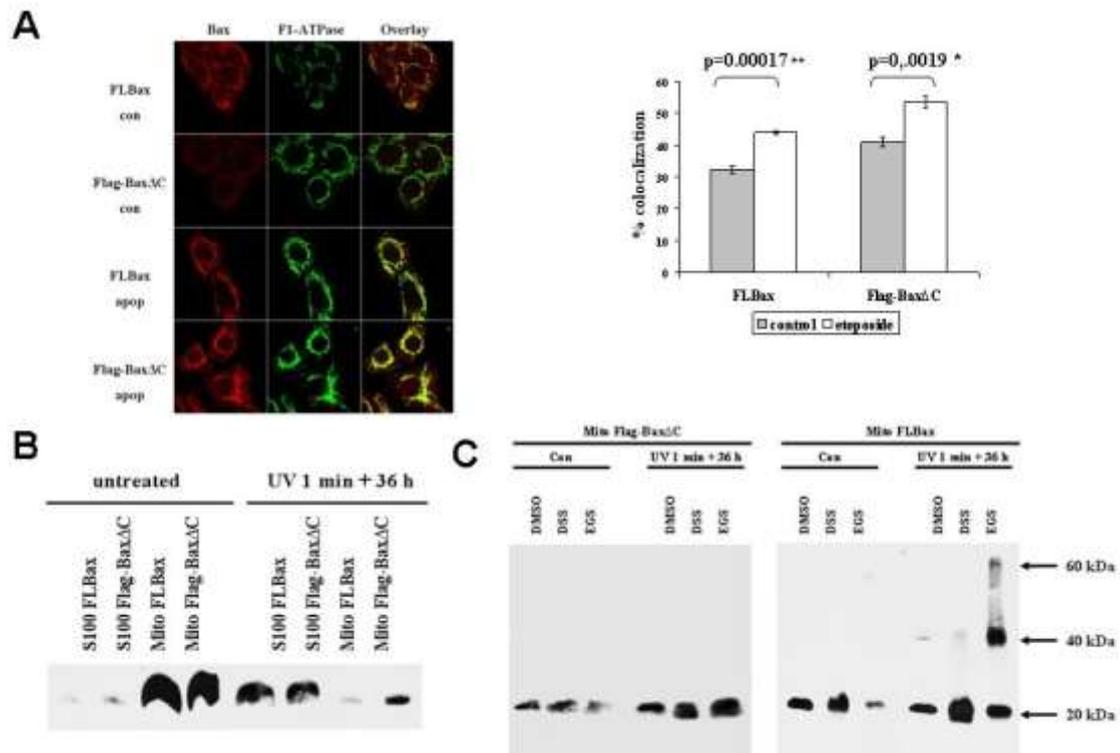


Figure 2: Er et al.

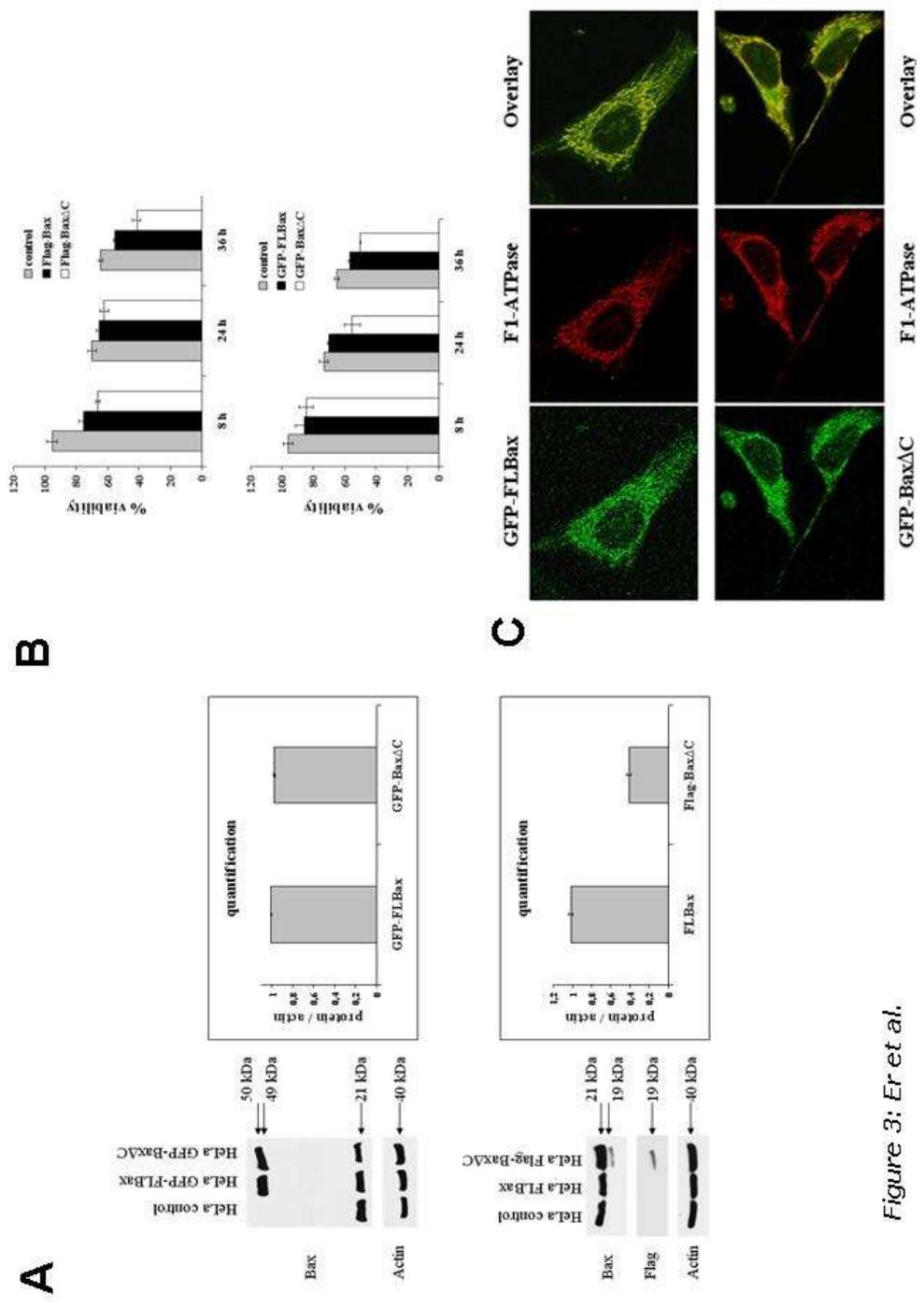


Figure 3: Er et al.

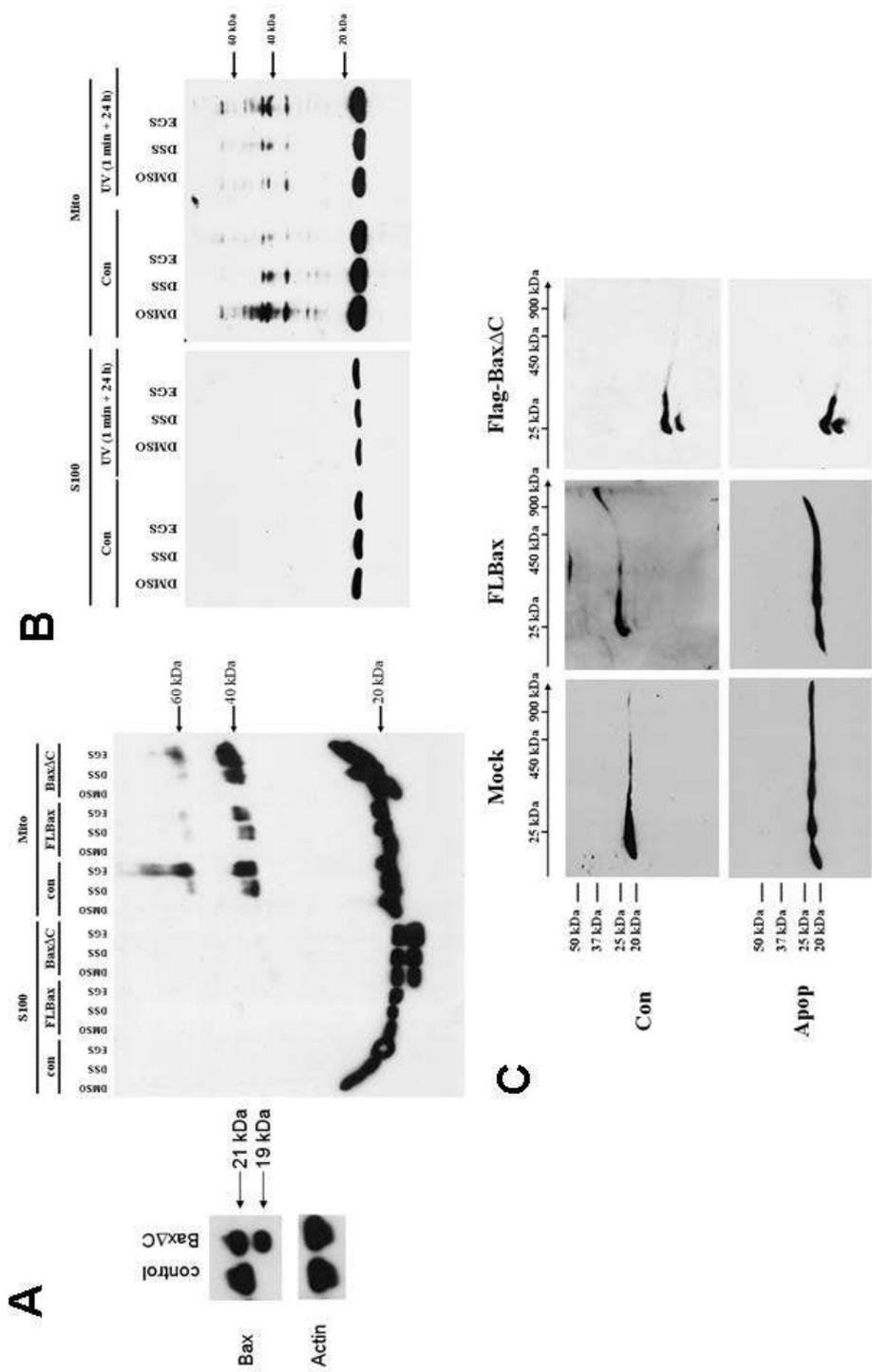


Figure 4: Er et al.

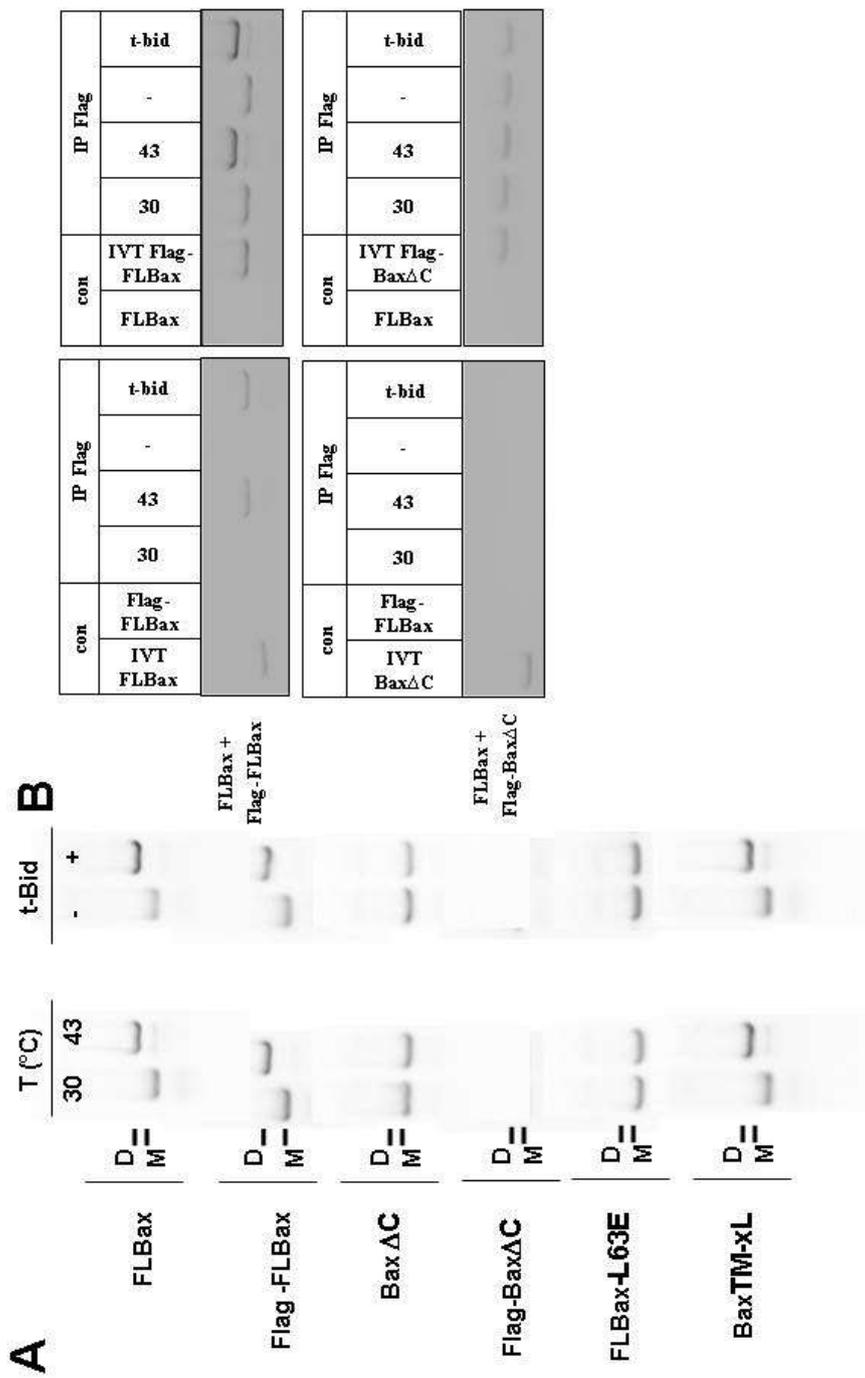


Figure 5: Er et al.

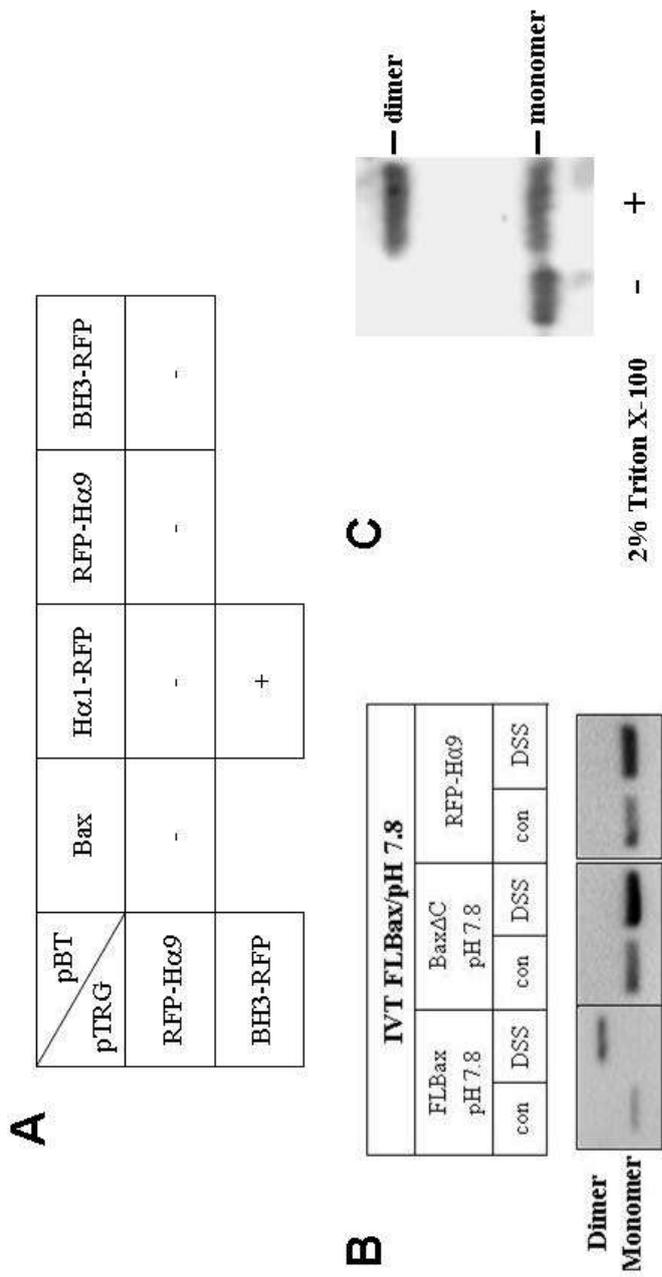


Figure 6: Er et al.

## **Matériel et méthodes**

### ***Microinjection***

La veille de la microinjection, les cellules sont implantées sur lamelles de verre stériles placées en plaque 24 puits. Le lendemain, les lamelles sont transférées en boîte de Pétri de 30mm de diamètre. Les cellules sont laissées au repos au minimum 1 heure avant l'expérience.

La microinjection est réalisée à l'aide d'un micromanipulateur InjectMan NI2 et d'un injecteur FemtoJet de chez Eppendorf. Les conditions d'injection utilisées sont de 150hPa et 0,1s pour tous les types de cellules cancéreuses utilisées ici, et de 100hPa et 0,1s pour les fibroblastes de rat.

La prostaglandine d'intérêt est diluée dans le PBS1X à une concentration 2X et mélangée volume-à-volume avec une sonde fluorescente 2X (FITC-dextran 70S 1%). Après centrifugation, le mélange est injecté dans le cytoplasme des cellules. Le nombre de cellules positives, i.e fluorescentes et viables, est déterminé 1 heure après l'injection à l'aide d'un microscope à fluorescence inversé (DMIRE2, Leica). Une centaine de cellules microinjectées est requise par condition pour que l'expérience soit validée. Le pourcentage de cellules présentant des caractéristiques morphologiques de cellules apoptotiques est ensuite établi toutes les heures pendant 5 à 6 heures suivant les cellules.

Lorsque la microinjection est réalisée en présence d'actinomycine D, l'actinomycine est ajoutée dans le milieu de culture 30mn avant le début de l'injection, puis laissée dans le milieu pendant toute la durée de l'expérience.

### ***Immunofluorescence***

Les cellules, implantées la veille sur lamelles de verre stériles, sont rincées au PBS puis fixées par un mélange PAF 4%-acide picrique 0,19% pendant 30mn. Toutes les étapes d'incubation sont réalisées à température ambiante. Après rinçage extensif au PBS, les cellules sont perméabilisées par du SDS 0,1%-PBS pendant 10mn. 3 rinçages au PBS sont réalisés,

puis une saturation des liaisons non spécifiques est effectuée en incubant les cellules dans de la gélatine 5%-PBS pendant une demie-heure. Les anticorps primaires et secondaires sont dilués en gélatine 1%-PBS et incubés successivement une heure avec les cellules. Les anticorps secondaires utilisés sont couplés à un fluorochrome (Alexa 488 ou 568) permettant leur observation en microscopie confocale.

Lorsque les cellules sont fixées après microinjection, la sonde fluorescente utilisée pour la microinjection est une sonde fixable (Oregon Green), résistant à la perméabilisation membranaire.

## ***Cross-linking***

Les cross-linkings sont effectués à partir de lysats protéiques ou de protéine recombinante purifiée. Les lysats cellulaires sont réalisés dans un tampon dépourvu de détergent capable de modifier la conformation de Bax (composition du tampon CHAPS). Le Bax humain recombinant His-taggé a été purifié dans le laboratoire comme décrit par ailleurs, en conditions dénaturantes. Le Bax murin recombinant provient de ProteinXLab et est tronqué de ses hélices  $\alpha 1$  et  $\alpha 9$ .

Les protéines sont incubées avec PGE2 pendant 1h à 30°C dans du PBS 1X. Après incubation, la réaction de pontage est réalisée avec 2 agents pontants différents, DSS et EGS (Pierce) à 5mM pendant 2h sur glace. La réaction est ensuite stoppée par l'ajout de TRIS 50mM final, incubé 15mn à température ambiante. Les échantillons sont ensuite dénaturés par l'ajout de tampon de migration et chauffés à 95°C pendant 10mn. Les protéines sont ensuite séparées par SDS-PAGE, puis transférées sur membranes traitées par Western Blot.

## ***Mutagenèse dirigée***

La mutagenèse dirigée des cystéines de Bax en sérines a été réalisée par l'intermédiaire du kit Gene Tailor (Invitrogen). Les séquences des amorces de PCR utilisées sont les suivantes :

C62S :      sens 5'-AAG AAG CTG AGC GAG TCT CTC AAG CGC-3'

antisens 5'-CTC GCT CAG CTT CTT GGT GGA CGC ATC C-3'  
C126S : sens 5'-GTG CTC AAG GCC CTG TCT ACC AAG GTG C-3'  
antisens 5'-ACA GGG CCT TGA GCA CCA GTT TGC TGG C-3'.

## **Méthylation de la matrice**

Un plasmide d'expression chez les Mammifères, contenant le cDNA de Bax sous le contrôle d'un promoteur CMV, a été utilisé comme matrice de la PCR (pRcCMV-Bax). La matrice est tout d'abord méthylée par une DNA méthylase en présence de SAM.

## **PCR imparfaite**

Une PCR est ensuite réalisée à partir de la matrice méthylée à l'aide des amorces ci-dessus. Ces amorces présentent une substitution d'un codon (TCT au lieu de TGT pour la mutation C62S ou au lieu de TGC pour la mutation C126S). La polymérase utilisée est une polymérase de haute fidélité (Pfu Turbo Hotstart). Les brins néosynthétisés sont donc non méthylés et mutés.

## **Transformation des bactéries**

Les bactéries utilisées pour la circularisation et l'amplification du plasmide muté sont les bactéries One-Shot® MAX Efficiency® DH5α<sup>TM</sup>-T1® (Invitrogen). 2µl du produit de PCR sont ajoutés à 50µl de suspension de bactéries compétentes ; l'ensemble est incubé 10mn sur glace. Les bactéries subissent ensuite un choc thermique de 30s à 42°C puis sont replacées sur glace. Un milieu riche (SOC 200µl) est ajouté aux bactéries choquées qui sont ensuite incubées 1 heure à 37°C sous agitation. 125µl de suspension bactérienne sont étalés sur un milieu sélectif (LB Agar ampicilline 100mg/ml) et cultivées sur la nuit à 37°C. Les bactéries transformées circularisent le plasmide muté et lysent l'ADN matrice méthylé par l'endonucléase McrBC.

Le plasmide muté est purifié de façon classique par l'utilisation d'un kit de mini-prep d'ADN (QIAPREP Spin Miniprep kit #27106) et séquencé pour s'assurer de l'efficacité de la

mutagenèse. Une fois la séquence du plasmide vérifiée, le plasmide est purifié en midi-prep (QIAGEN plasmid midi kit #12143).

## **Transfection des cellules**

### **Electroporation**

Les primocultures de GBM sont transfectées par électroporation. Les cellules cultivées en milieu RPMI1640-10% SVF sont décollées par la trypsine et centrifugées 5mn 800rpm. Le culot cellulaire est resuspendu en milieu RPMI1640 sans sérum et les cellules sont comptées à la cellule de Malassez. La densité cellulaire est ajustée à  $10^6$  cellules/ml en RPMI1640 sans sérum. Les cellules en suspension sont placées dans une cuve d'électroporation (1ml par condition) et 10 $\mu$ g du plasmide à transférer sont ajoutés.

L'électroporation est réalisée à l'aide d'un électroporateur BIORAD Gene-Pulser. Deux impulsions électriques de 200V et 250 $\mu$ Fa sont appliquées aux cellules. Elles sont ensuite récupérées dans la cuve et mises en culture en milieu complet en plaque 6 puits. Après 24 à 48h, lorsqu'elles arrivent à confluence, les cellules sont transférées en boîtes de Pétri 100mm et sélectionnées avec l'antibiotique adéquat (G418 250 $\mu$ g/ml ou hygromycine 125 $\mu$ g/ml).

### **Transfection par agent lipofectant**

Les lignées cellulaires (LN18, DU145) sont transfectées par un agent lipofectant (Lipofectamine 2000, Invitrogen). Les cellules sont implantées en plaque 6 puits ( $5 \cdot 10^5$  cellules par puits) la veille de la transfection. La transfection est réalisée selon les instructions du fournisseur avec 4 $\mu$ g d'ADN plasmidique et 10 $\mu$ l de lipofectamine par réaction. Les cellules sont incubées avec les complexes pendant 8h à 37°C. La sélection par l'antibiotique adéquat commence le lendemain de la transfection jusqu'à la mort de 100% des cellules non transfectées.

## ***Epitope mapping***

L'epitope mapping est réalisé à partir d'une membrane Amino-PEG<sub>500</sub>-UC540 (Intavis AG). La séquence de Bax est découpée en une série de peptides de 12 acides aminés, chaque peptide répétant les 10 derniers acides aminés du précédent. Ces peptides sont fixés à l'aide d'un automate de façon ordonnée sur une membrane de cellulose, par l'intermédiaire d'un linker de 8 à 10 motifs d'éthylène glycol. Après démasquage des peptides fixés, la membrane est saturée par de la BSA5%. La membrane est ensuite incubée avec du PGE<sub>2</sub>-biotinimide (Cayman #10006987) pendant une nuit à 4°C sous agitation. Après lavages, la membrane est incubée à nouveau en présence de streptavidine couplée à une peroxydase. La fixation est révélée par électrochimiluminescence et détectée sur film radiographique. Le signal est ensuite quantifié en triplicate par informatique.

## Références bibliographiques

1. Ohgaki, H. & Kleihues, P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol (Berl)* **109**, 93-108 (2005).
2. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70 (2000).
3. Dikov, M.M. et al. Differential Roles of Vascular Endothelial Growth Factor Receptors 1 and 2 in Dendritic Cell Differentiation. *J Immunol* **174**, 215-222 (2005).
4. Zou, J.-P. et al. Human Glioma-Induced Immunosuppression Involves Soluble Factor(s) That Alters Monocyte Cytokine Profile and Surface Markers. *J Immunol* **162**, 4882-4892 (1999).
5. Akasaki, Y. et al. Induction of a CD4+ T Regulatory Type 1 Response by Cyclooxygenase-2-Overexpressing Glioma. *J Immunol* **173**, 4352-4359 (2004).
6. Er, E. et al. Mitochondria as the target of the pro-apoptotic protein Bax. *Biochim Biophys Acta* (2006).
7. Cory, S. & Adams, J.M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* **2**, 647-56 (2002).
8. Aritomi, M. et al. Crystal structure of rat Bcl-xL. Implications for the function of the Bcl-2 protein family. *J Biol Chem* **272**, 27886-92 (1997).
9. Petros, A.M. et al. Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3012-7 (2001).
10. Day, C.L. et al. Solution structure of prosurvival Mcl-1 and characterization of its binding by proapoptotic BH3-only ligands. *J Biol Chem* **280**, 4738-44 (2005).
11. Zhang, H. et al. Structural basis of BFL-1 for its interaction with BAX and its anti-apoptotic action in mammalian and yeast cells. *J Biol Chem* **275**, 11092-9 (2000).
12. Hsu, Y.T., Wolter, K.G. & Youle, R.J. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3668-72 (1997).
13. Suzuki, M., Youle, R.J. & Tjandra, N. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* **103**, 645-54 (2000).
14. Verma, Y.K. et al. Cell death regulation by B-cell lymphoma protein. *Apoptosis* **11**, 459-71 (2006).
15. Cartron, P.F. et al. Nonredundant role of Bax and Bak in Bid-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* **23**, 4701-12 (2003).
16. Cheng, E.H. et al. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* **8**, 705-11 (2001).
17. Cartron, P.F. et al. 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**, 807-18 (2004).
18. Moreau, C. et al. Minimal BH3 peptides promote cell death by antagonizing anti-apoptotic proteins. *J Biol Chem* **278**, 19426-35 (2003).
19. Yasuda, M., Theodorakis, P., Subramanian, T. & Chinnadurai, G. Adenovirus E1B-19K/BCL-2 interacting protein BNIP3 contains a BH3 domain and a mitochondrial targeting sequence. *J Biol Chem* **273**, 12415-21 (1998).
20. Hsu, Y.T. & Youle, R.J. Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. *J Biol Chem* **273**, 10777-83 (1998).
21. Li, L.Y., Luo, X. & Wang, X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **412**, 95-9 (2001).

22. Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. & Wang, X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**, 33-42 (2000).
23. Suzuki, Y. et al. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* **8**, 613-21 (2001).
24. Arnoult, D. et al. Bax/Bak-dependent release of DDP/TIMM8a promotes Drp1-mediated mitochondrial fission and mitoptosis during programmed cell death. *Curr Biol* **15**, 2112-8 (2005).
25. Susin, S.A. et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**, 441-6 (1999).
26. Cartron, P.F., Oliver, L., Mayat, E., Meflah, K. & Vallette, F.M. Impact of pH on Bax alpha conformation, oligomerisation and mitochondrial integration. *FEBS Lett* **578**, 41-6 (2004).
27. Makin, G.W. et al. Damage-induced Bax N-terminal change, translocation to mitochondria and formation of Bax dimers/complexes occur regardless of cell fate. *Embo J* **20**, 6306-15 (2001).
28. Cartron, P.F. et al. The N-terminal end of Bax contains a mitochondrial-targeting signal. *J Biol Chem* **278**, 11633-41 (2003).
29. Goping, I.S. et al. Regulated targeting of BAX to mitochondria. *J Cell Biol* **143**, 207-15 (1998).
30. Cartron, P.F. et al. The expression of a new variant of the pro-apoptotic molecule Bax, Baxpsi, is correlated with an increased survival of glioblastoma multiforme patients. *Hum Mol Genet* **11**, 675-87 (2002).
31. Cartron, P.F. et al. Distinct domains control the addressing and the insertion of Bax into mitochondria. *J Biol Chem* **280**, 10587-98 (2005).
32. Nouraini, S., Six, E., Matsuyama, S., Krajewski, S. & Reed, J.C. The putative pore-forming domain of Bax regulates mitochondrial localization and interaction with Bcl-X(L). *Mol Cell Biol* **20**, 1604-15 (2000).
33. Annis, M.G. et al. Bax forms multispinning monomers that oligomerize to permeabilize membranes during apoptosis. *Embo J* **24**, 2096-103 (2005).
34. Garcia-Saez, A.J., Mingarro, I., Perez-Paya, E. & Salgado, J. Membrane-insertion fragments of Bcl-xL, Bax, and Bid. *Biochemistry* **43**, 10930-43 (2004).
35. Minn, A.J. et al. Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* **385**, 353-7 (1997).
36. Schendel, S.L. et al. Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5113-8 (1997).
37. Schendel, S.L. et al. Ion channel activity of the BH3 only Bcl-2 family member, BID. *J Biol Chem* **274**, 21932-6 (1999).
38. Nechushtan, A., Smith, C.L., Hsu, Y.T. & Youle, R.J. Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. *Embo J* **18**, 2330-41 (1999).
39. Gardai, S.J. et al. Phosphorylation of Bax Ser184 by Akt regulates its activity and apoptosis in neutrophils. *J Biol Chem* **279**, 21085-95 (2004).
40. Terrones, O. et al. Lipidic pore formation by the concerted action of proapoptotic BAX and tBID. *J Biol Chem* **279**, 30081-91 (2004).
41. Zha, H., Aime-Sempe, C., Sato, T. & Reed, J.C. 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**, 7440-4 (1996).
42. Zha, H. & Reed, J.C. Heterodimerization-independent functions of cell death regulatory proteins Bax and Bcl-2 in yeast and mammalian cells. *J Biol Chem* **272**, 31482-8 (1997).

43. Sattler, M. et al. Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* **275**, 983-6 (1997).
44. Gurudutta, G.U. et al. Structural conservation of residues in BH1 and BH2 domains of Bcl-2 family proteins. *FEBS Lett* **579**, 3503-7 (2005).
45. Sawada, M., Hayes, P. & Matsuyama, S. Cytoprotective membrane-permeable peptides designed from the Bax-binding domain of Ku70. *Nat Cell Biol* **5**, 352-7 (2003).
46. Nomura, M. et al. 14-3-3 Interacts directly with and negatively regulates pro-apoptotic Bax. *J Biol Chem* **278**, 2058-65 (2003).
47. Guo, B. et al. Humanin peptide suppresses apoptosis by interfering with Bax activation. *Nature* **423**, 456-61 (2003).
48. Zhang, H. et al. Clusterin inhibits apoptosis by interacting with activated Bax. *Nat Cell Biol* **7**, 909-15 (2005).
49. Cartron, P.F., Oliver, L., Juin, P., Meflah, K. & Vallette, F.M. The p18 truncated form of Bax behaves like a Bcl-2 homology domain 3-only protein. *J Biol Chem* **279**, 11503-12 (2004).
50. Stankiewicz, A.R., Lachapelle, G., Foo, C.P., Radicioni, S.M. & Mosser, D.D. Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J Biol Chem* **280**, 38729-39 (2005).
51. Letai, A. et al. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* **2**, 183-92 (2002).
52. Dlugosz, P.J. et al. Bcl-2 changes conformation to inhibit Bax oligomerization. *Embo J* **25**, 2287-96 (2006).
53. Don, A.S. & Hogg, P.J. Mitochondria as cancer drug targets. *Trends Mol Med* **10**, 372-8 (2004).
54. Narita, M. et al. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *PNAS* **95**, 14681-14686 (1998).
55. Shimizu, S., Narita, M., Tsujimoto, Y. & Tsujimoto, Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* **399**, 483-487 (1999).
56. Zamzami, N. et al. Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis. *FEBS Lett* **384**, 53-7 (1996).
57. Arnoult, D. et al. Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *Embo J* **22**, 4385-99 (2003).
58. Goldstein, J.C., Waterhouse, N.J., Juin, P., Evan, G.I. & Green, D.R. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol* **2**, 156-162 (2000).
59. Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B. & Martinou, J.-C. Bid Induces the Oligomerization and Insertion of Bax into the Outer Mitochondrial Membrane. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 929-935 (2000).
60. Guihard, G. et al. The mitochondrial apoptosis-induced channel (MAC) corresponds to a late apoptotic event. *J Biol Chem* **279**, 46542-50 (2004).
61. Dejean, L.M., Martinez-Caballero, S., Manon, S. & Kinnally, K.W. Regulation of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC, by BCL-2 family proteins. *Biochim Biophys Acta* **1762**, 191-201 (2006).
62. Shimizu, S., Ide, T., Yanagida, T. & Tsujimoto, Y. Electrophysiological Study of a Novel Large Pore Formed by Bax and the Voltage-dependent Anion Channel That Is Permeable to Cytochrome c. *J. Biol. Chem.* **275**, 12321-12325 (2000).

63. Basanez, G. et al. Bax-type Apoptotic Proteins Porate Pure Lipid Bilayers through a Mechanism Sensitive to Intrinsic Monolayer Curvature. *J. Biol. Chem.* **277**, 49360-49365 (2002).
64. Esposti, M.D., Erler, J.T., Hickman, J.A. & Dive, C. Bid, a widely expressed proapoptotic protein of the Bcl-2 family, displays lipid transfer activity. *Mol Cell Biol* **21**, 7268-76 (2001).
65. Garcia-Saez, A.J. et al. Peptides corresponding to helices 5 and 6 of Bax can independently form large lipid pores. *FEBS Journal* **273**, 971-981 (2006).
66. Desagher, S. & Martinou, J.C. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* **10**, 369-77 (2000).
67. Martinou, J.C. & Youle, R.J. Which came first, the cytochrome c release or the mitochondrial fission? *Cell Death Differ* **13**, 1291-5 (2006).
68. Susin, S.A. et al. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* **192**, 571-80 (2000).
69. van Loo, G. et al. The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ* **9**, 1031-42 (2002).
70. Kawano, T. et al. Prostaglandin E2 EP1 receptors: downstream effectors of COX-2 neurotoxicity. *Nat Med* **12**, 225-9 (2006).
71. Balsinde, J., Balboa, M.A., Insel, P.A. & Dennis, E.A. Regulation and inhibition of phospholipase A2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **39**, 175-89 (1999).
72. Hirabayashi, T. & Shimizu, T. Localization and regulation of cytosolic phospholipase A(2). *Biochim Biophys Acta* **1488**, 124-38 (2000).
73. Park, J.Y., Pillinger, M.H. & Abramson, S.B. Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. *Clin Immunol* **119**, 229-40 (2006).
74. Smith, W.L., DeWitt, D.L. & Garavito, R.M. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* **69**, 145-82 (2000).
75. Tanabe, T. & Tohnai, N. Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**, 95-114 (2002).
76. Hewett, S.J., Uliasz, T.F., Vidwans, A.S. & Hewett, J.A. Cyclooxygenase-2 contributes to N-methyl-D-aspartate-mediated neuronal cell death in primary cortical cell culture. *J Pharmacol Exp Ther* **293**, 417-25 (2000).
77. Balsinde, J. et al. Group V phospholipase A(2)-dependent induction of cyclooxygenase-2 in macrophages. *J Biol Chem* **274**, 25967-70 (1999).
78. Garavito, R.M. & DeWitt, D.L. The cyclooxygenase isoforms: structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. *Biochim Biophys Acta* **1441**, 278-87 (1999).
79. Botting, R.M. Mechanism of action of acetaminophen: is there a cyclooxygenase 3? *Clin Infect Dis* **31 Suppl 5**, S202-10 (2000).
80. Willoughby, D.A., Moore, A.R. & Colville-Nash, P.R. COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. *Lancet* **355**, 646-8 (2000).
81. Chandrasekharan, S. et al. Efficacy and safety of nateglinide in the treatment of type II diabetes mellitus. *J Indian Med Assoc* **100**, 467-8 (2002).
82. Qin, N., Zhang, S.P., Reitz, T.L., Mei, J.M. & Flores, C.M. Cloning, expression, and functional characterization of human cyclooxygenase-1 splicing variants: evidence for intron 1 retention. *J Pharmacol Exp Ther* **315**, 1298-305 (2005).
83. Chan, T.A., Morin, P.J., Vogelstein, B. & Kinzler, K.W. Mechanisms underlying nonsteroidal antiinflammatory drug-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 681-6 (1998).

84. Loftin, C.D., Tiano, H.F. & Langenbach, R. Phenotypes of the COX-deficient mice indicate physiological and pathophysiological roles for COX-1 and COX-2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**, 177-85 (2002).
85. Jakobsson, P.J., Thoren, S., Morgenstern, R. & Samuelsson, B. Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7220-5 (1999).
86. Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. A model for p53-induced apoptosis. *Nature* **389**, 300-5 (1997).
87. Murakami, M. et al. Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* **275**, 32783-92 (2000).
88. Forsberg, L., Leeb, L., Thoren, S., Morgenstern, R. & Jakobsson, P. Human glutathione dependent prostaglandin E synthase: gene structure and regulation. *FEBS Lett* **471**, 78-82 (2000).
89. Ekstrom, L., Lyrenas, L., Jakobsson, P.J., Morgenstern, R. & Kelner, M.J. Basal expression of the human MAPEG members microsomal glutathione transferase 1 and prostaglandin E synthase genes is mediated by Sp1 and Sp3. *Biochim Biophys Acta* **1627**, 79-84 (2003).
90. Naraba, H. et al. Transcriptional regulation of the membrane-associated prostaglandin E2 synthase gene. Essential role of the transcription factor Egr-1. *J Biol Chem* **277**, 28601-8 (2002).
91. Thoren, S. & Jakobsson, P.J. Coordinate up- and down-regulation of glutathione-dependent prostaglandin E synthase and cyclooxygenase-2 in A549 cells. Inhibition by NS-398 and leukotriene C4. *Eur J Biochem* **267**, 6428-34 (2000).
92. Murakami, M. et al. Cellular prostaglandin E2 production by membrane-bound prostaglandin E synthase-2 via both cyclooxygenases-1 and -2. *J Biol Chem* **278**, 37937-47 (2003).
93. Thoren, S. et al. Human microsomal prostaglandin E synthase-1: purification, functional characterization, and projection structure determination. *J Biol Chem* **278**, 22199-209 (2003).
94. Trebino, C.E. et al. Impaired inflammatory and pain responses in mice lacking an inducible prostaglandin E synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9044-9 (2003).
95. Premyslova, M., Chisaka, H., Okamura, K. & Challis, J.R. IL-1beta treatment does not co-ordinately up-regulate mPGES-1 and COX-2 mRNA expression, but results in higher degree of cellular and intracellular co-localization of their immunoreactive proteins in human placenta trophoblast cells. *Placenta* **27**, 576-86 (2006).
96. Engblom, D. et al. Microsomal prostaglandin E synthase-1 is the central switch during immune-induced pyresis. *Nat Neurosci* **6**, 1137-8 (2003).
97. Tanioka, T., Nakatani, Y., Semmyo, N., Murakami, M. & Kudo, I. Molecular identification of cytosolic prostaglandin E2 synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E2 biosynthesis. *J Biol Chem* **275**, 32775-82 (2000).
98. Watanabe, K., Kurihara, K., Tokunaga, Y. & Hayaishi, O. Two types of microsomal prostaglandin E synthase: glutathione-dependent and -independent prostaglandin E synthases. *Biochem Biophys Res Commun* **235**, 148-52 (1997).
99. Ogino, N., Miyamoto, T., Yamamoto, S. & Hayaishi, O. Prostaglandin endoperoxide E isomerase from bovine vesicular gland microsomes, a glutathione-requiring enzyme. *J Biol Chem* **252**, 890-5 (1977).

100. Tanikawa, N. et al. Identification and characterization of a novel type of membrane-associated prostaglandin E synthase. *Biochem Biophys Res Commun* **291**, 884-9 (2002).
101. Gudis, K. et al. Microsomal prostaglandin E synthase (mPGES)-1, mPGES-2 and cytosolic PGES expression in human gastritis and gastric ulcer tissue. *Lab Invest* **85**, 225-36 (2005).
102. Yamada, T., Komoto, J., Watanabe, K., Ohmiya, Y. & Takusagawa, F. Crystal structure and possible catalytic mechanism of microsomal prostaglandin E synthase type 2 (mPGES-2). *J Mol Biol* **348**, 1163-76 (2005).
103. Gupta, R.A. & Dubois, R.N. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat Rev Cancer* **1**, 11-21 (2001).
104. Tai, H.H., Ensor, C.M., Tong, M., Zhou, H. & Yan, F. Prostaglandin catabolizing enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**, 483-93 (2002).
105. Greenland, K.J. et al. The human NAD<sup>+</sup>-dependent 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase gene promoter is controlled by Ets and activating protein-1 transcription factors and progesterone. *Endocrinology* **141**, 581-97 (2000).
106. Kronic, N., Adamson, S.L., Ackerley, C., Okita, R.T. & Coceani, F. Perinatal changes in choroidal 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase: implications for prostaglandin removal from brain. *Brain Res Dev Brain Res* **121**, 145-55 (2000).
107. Ding, Y., Tong, M., Liu, S., Moscow, J.A. & Tai, H.H. NAD<sup>+</sup>-linked 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) behaves as a tumor suppressor in lung cancer. *Carcinogenesis* **26**, 65-72 (2005).
108. Tong, M. & Tai, H.H. Induction of NAD<sup>(+)</sup>-linked 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase expression by androgens in human prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **276**, 77-81 (2000).
109. Moreno, J., Krishnan, A.V. & Feldman, D. Molecular mechanisms mediating the anti-proliferative effects of Vitamin D in prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* **97**, 31-6 (2005).
110. Yan, M. et al. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase, a COX-2 oncogene antagonist, is a TGF-beta-induced suppressor of human gastrointestinal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 17468-73 (2004).
111. Backlund, M.G. et al. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase is down-regulated in colorectal cancer. *J Biol Chem* **280**, 3217-23 (2005).
112. Mann, J.R. et al. Repression of prostaglandin dehydrogenase by epidermal growth factor and snail increases prostaglandin E2 and promotes cancer progression. *Cancer Res* **66**, 6649-56 (2006).
113. Celis, J.E. et al. Loss of adipocyte-type fatty acid binding protein and other protein biomarkers is associated with progression of human bladder transitional cell carcinomas. *Cancer Res* **56**, 4782-90 (1996).
114. Celis, J.E. et al. Molecular pathology of breast apocrine carcinomas: a protein expression signature specific for benign apocrine metaplasia. *FEBS Lett* **580**, 2935-44 (2006).
115. Cho, H. & Tai, H.H. Inhibition of NAD<sup>+</sup>-dependent 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) by cyclooxygenase inhibitors and chemopreventive agents. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **67**, 461-5 (2002).
116. Ivanov, A.I., Scheck, A.C. & Romanovsky, A.A. Expression of genes controlling transport and catabolism of prostaglandin E2 in lipopolysaccharide fever. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **284**, R698-706 (2003).
117. Schuster, V.L. Prostaglandin transport. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**, 633-47 (2002).

118. Banu, S.K., Arosh, J.A., Chapdelaine, P. & Fortier, M.A. Molecular cloning and spatio-temporal expression of the prostaglandin transporter: a basis for the action of prostaglandins in the bovine reproductive system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11747-52 (2003).
119. Chan, B.S., Satriano, J.A., Pucci, M. & Schuster, V.L. Mechanism of prostaglandin E2 transport across the plasma membrane of HeLa cells and *Xenopus* oocytes expressing the prostaglandin transporter "PGT". *J Biol Chem* **273**, 6689-97 (1998).
120. Reid, G. et al. The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9244-9 (2003).
121. Hirrlinger, J., König, J. & Dringen, R. Expression of mRNAs of multidrug resistance proteins (Mrps) in cultured rat astrocytes, oligodendrocytes, microglial cells and neurones. *J Neurochem* **82**, 716-9 (2002).
122. Breyer, R.M., Bagdassarian, C.K., Myers, S.A. & Breyer, M.D. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**, 661-90 (2001).
123. Tsuboi, K., Sugimoto, Y. & Ichikawa, A. Prostanoid receptor subtypes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**, 535-56 (2002).
124. Oliva, J.L. et al. The cyclopentenone 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 binds to and activates H-Ras. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4772-7 (2003).
125. Zhang, X. et al. Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4459-64 (2005).
126. Ushikubi, F., Sugimoto, Y., Ichikawa, A. & Narumiya, S. Roles of prostanoids revealed from studies using mice lacking specific prostanoid receptors. *Jpn J Pharmacol* **83**, 279-85 (2000).
127. McMahan, S.B., Cafferty, W.B. & Marchand, F. Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. *Exp Neurol* **192**, 444-62 (2005).
128. Harris, S.G., Padilla, J., Koumas, L., Ray, D. & Phipps, R.P. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol* **23**, 144-50 (2002).
129. Ivanov, A.I., Pero, R.S., Scheck, A.C. & Romanovsky, A.A. Prostaglandin E2-synthesizing enzymes in fever: differential transcriptional regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **283**, R1104-1117 (2002).
130. Consilvio, C., Vincent, A.M. & Feldman, E.L. Neuroinflammation, COX-2, and ALS - a dual role? *Exp Neurol* **187**, 1-10 (2004).
131. Andreasson, K.I. et al. Age-dependent cognitive deficits and neuronal apoptosis in cyclooxygenase-2 transgenic mice. *J Neurosci* **21**, 8198-209 (2001).
132. McGeer, P.L. & McGeer, E.G. Inflammation, autotoxicity and Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* **22**, 799-809 (2001).
133. Yasojima, K., Tourtellotte, W.W., McGeer, E.G. & McGeer, P.L. Marked increase in cyclooxygenase-2 in ALS spinal cord: implications for therapy. *Neurology* **57**, 952-6 (2001).
134. Teismann, P. et al. Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration. *PNAS* **100**, 5473-5478 (2003).
135. McCullough, L. et al. Neuroprotective function of the PGE2 EP2 receptor in cerebral ischemia. *J Neurosci* **24**, 257-68 (2004).
136. Ahmad, A.S., Ahmad, M., de Brum-Fernandes, A.J. & Dore, S. Prostaglandin EP4 receptor agonist protects against acute neurotoxicity. *Brain Res* **1066**, 71-7 (2005).
137. Wang, D. & DuBois, R.N. PROSTAGLANDINS AND CANCER. *Gut* **55**, 115-122 (2006).

138. Smith, M.L., Hawcroft, G. & Hull, M.A. The effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on human colorectal cancer cells: evidence of different mechanisms of action. *Eur J Cancer* **36**, 664-74 (2000).
139. Shono, T., Tofilon, P.J., Bruner, J.M., Owolabi, O. & Lang, F.F. Cyclooxygenase-2 expression in human gliomas: prognostic significance and molecular correlations. *Cancer Res* **61**, 4375-81 (2001).
140. Gee, J.R., Montoya, R.G., Khaled, H.M., Sabichi, A.L. & Grossman, H.B. Cytokeratin 20, AN43, PGDH, and COX-2 expression in transitional and squamous cell carcinoma of the bladder. *Urol Oncol* **21**, 266-70 (2003).
141. Yoshimatsu, K. et al. Inducible prostaglandin E synthase is overexpressed in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **7**, 2669-74 (2001).
142. Einspahr, J.G. et al. Association between Cyclooxygenase expression and colorectal adenoma characteristics. *Cancer Res* **63**, 3891-3 (2003).
143. Schmitz, K.J. et al. Overexpression of cyclo-oxygenase-2 is an independent predictor of unfavourable outcome in node-negative breast cancer, but is not associated with protein kinase B (Akt) and mitogen-activated protein kinase (ERK1/2, p38) activation or with Her-2/neu signalling pathways. *J Clin Pathol* **59**, 685-91 (2006).
144. Joki, T. et al. Expression of cyclooxygenase 2 (COX-2) in human glioma and in vitro inhibition by a specific COX-2 inhibitor, NS-398. *Cancer Res* **60**, 4926-31 (2000).
145. Prayson, R.A., Castilla, E.A., Vogelbaum, M.A. & Barnett, G.H. Cyclooxygenase-2 (COX-2) expression by immunohistochemistry in glioblastoma multiforme. *Ann Diagn Pathol* **6**, 148-53 (2002).
146. Yoshimatsu, K. et al. Inducible microsomal prostaglandin E synthase is overexpressed in colorectal adenomas and cancer. *Clin Cancer Res* **7**, 3971-6 (2001).
147. Chang, S.H. et al. Role of prostaglandin E2-dependent angiogenic switch in cyclooxygenase 2-induced breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 591-6 (2004).
148. Chell, S.D. et al. Increased EP4 receptor expression in colorectal cancer progression promotes cell growth and anchorage independence. *Cancer Res* **66**, 3106-13 (2006).
149. Wang, D. & Dubois, R.N. Prostaglandins and cancer. *Gut* **55**, 115-22 (2006).
150. Munkarah, A.R. et al. Effects of prostaglandin E(2) on proliferation and apoptosis of epithelial ovarian cancer cells. *J Soc Gynecol Investig* **9**, 168-73 (2002).
151. Wang, D. et al. Prostaglandin E(2) promotes colorectal adenoma growth via transactivation of the nuclear peroxisome proliferator-activated receptor delta. *Cancer Cell* **6**, 285-95 (2004).
152. Dormond, O., Foletti, A., Paroz, C. & Ruegg, C. NSAIDs inhibit alpha V beta 3 integrin-mediated and Cdc42/Rac-dependent endothelial-cell spreading, migration and angiogenesis. *Nat Med* **7**, 1041-7 (2001).
153. Buchanan, F.G., Wang, D., Bargiacchi, F. & DuBois, R.N. Prostaglandin E2 regulates cell migration via the intracellular activation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* **278**, 35451-7 (2003).
154. Ogunwobi, O., Mutungi, G. & Beales, I.L. Leptin Stimulates Proliferation and Inhibits Apoptosis in Barrett's Esophageal Adenocarcinoma Cells by Cyclooxygenase-2-Dependent, Prostaglandin-E2-Mediated Transactivation of the Epidermal Growth Factor Receptor and c-Jun NH2-Terminal Kinase Activation. *Endocrinology* **147**, 4505-16 (2006).
155. Hayaishi, O. Sleep-wake regulation by prostaglandins D2 and E2. *J. Biol. Chem.* **263**, 14593-14596 (1988).

156. Perez-Sala, D., Cernuda-Morollon, E. & Canada, F.J. Molecular basis for the direct inhibition of AP-1 DNA binding by 15-deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2. *J Biol Chem* **278**, 51251-60 (2003).
157. Shiraki, T. et al. Alpha,beta-unsaturated ketone is a core moiety of natural ligands for covalent binding to peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* **280**, 14145-53 (2005).
158. Golijanin, D. et al. Cyclooxygenase-2 and Microsomal Prostaglandin E Synthase-1 Are Overexpressed in Squamous Cell Carcinoma of the Penis. *Clin Cancer Res* **10**, 1024-1031 (2004).
159. Blaine, S.A. et al. Targeted over-expression of mPGES-1 and elevated PGE2 production is not sufficient for lung tumorigenesis in mice. *Carcinogenesis* **26**, 209-217 (2005).
160. Payner, T. et al. Microsomal prostaglandin E synthase-1 regulates human glioma cell growth via prostaglandin E2-dependent activation of type II protein kinase A. *Mol Cancer Ther* **5**, 1817-1826 (2006).
161. Castellone, M.D., Teramoto, H., Williams, B.O., Druey, K.M. & Gutkind, J.S. Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin-beta-catenin signaling axis. *Science* **310**, 1504-10 (2005).
162. Evan, G.I. & Vousden, K.H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* **411**, 342-8 (2001).
163. Bottone, F.G., Jr., Martinez, J.M., Collins, J.B., Afshari, C.A. & Eling, T.E. Gene modulation by the cyclooxygenase inhibitor, sulindac sulfide, in human colorectal carcinoma cells: possible link to apoptosis. *J Biol Chem* **278**, 25790-801 (2003).
164. Olsen, S.R. Taxanes and COX-2 inhibitors: from molecular pathways to clinical practice. *Biomed Pharmacother* **59 Suppl 2**, S306-10 (2005).

**Mise en évidence d'un marqueur de bon pronostic dans le glioblastome multiforme, l'enzyme mPGES-1 ; identification de son produit PGE<sub>2</sub> comme un nouvel activateur direct de la protéine pro-apoptotique Bax.**

Dans cette étude, la surexpression de mPGES-1, enzyme terminale de la synthèse de PGE<sub>2</sub>, dans le glioblastome multiforme (GBM) est corrélée à une survie prolongée des patients. mPGES-1 sensibilise les cellules de GBM à l'apoptose *in vitro*, spontanée et induite. Paradoxalement, alors que PGE<sub>2</sub> favorise la progression tumorale par une signalisation membranaire impliquant ses récepteurs EP, elle induit l'apoptose des cellules cancéreuses par une voie strictement intracellulaire, conférant à PGE<sub>2</sub> une fonction bipolaire dans la tumorigenèse. Nous établissons que PGE<sub>2</sub> interagit avec la protéine pro-apoptotique Bax et induit son activation. Enfin, l'interaction de PGE<sub>2</sub> avec Bax ainsi que l'activation de Bax induite par PGE<sub>2</sub> sont inhibées par la prostaglandine D<sub>2</sub>, autre prostaglandine majeure dans le système nerveux central. La région des hélices  $\alpha 5$ - $\alpha 6$ , responsable de l'insertion membranaire de Bax, semble fortement impliquée dans l'interaction, avec un rôle particulier de la cystéine 126.

Mots-clés : apoptose, prostaglandines, glioblastome multiforme, Bax.

**Designation of the enzyme mPGES-1 as a good prognostic factor in *glioblastoma multiforme*; identification of its product PGE<sub>2</sub> as a new direct activator of the proapoptotic protein Bax.**

In this study, the overexpression of mPGES-1, the terminal enzyme in PGE<sub>2</sub> synthesis, in *glioblastoma multiforme* (GBM) is correlated to a longer survival of patients. mPGES-1 increases the GBM cells sensibility to either spontaneous or induced apoptosis *in vitro*. Paradoxically, while PGE<sub>2</sub> facilitates tumoral progression through its membrane EP receptors, it induces cancerous cells apoptosis through a strict intracellular pathway, attributing a bipolar role to PGE<sub>2</sub> in tumorigenesis. We establish here that PGE<sub>2</sub> interacts with the proapoptotic protein Bax and activates it. At last, the interaction between Bax and PGE<sub>2</sub> and PGE<sub>2</sub> - induced Bax activation are inhibited by the prostaglandin D<sub>2</sub>, also a major prostaglandin in the central nervous system. The region encompassing helix  $\alpha 5$ - $\alpha 6$ , which is responsible for Bax membrane insertion, seems of high importance to the interaction, with a special role played by cystein 126.

Key words: apoptosis, prostaglandins, *glioblastoma multiforme*, Bax.

LALIER Lisenn

1 allée de la Reine Margot

44000 NANTES