

Thèse de Doctorat

Vincent MIGNARD

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : **Biologie Santé**

Discipline : *Biologie cellulaire*

Spécialité : *Cancérologie*

Unité de recherche : *U892*

Soutenue le *02/02/15*

Thèse N° : *(10)*

Rôle des sphingolipides et des MAM dans l'activité des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak

JURY

Rapporteurs : **Olivier CUVILLIER**, DR, CNRS
Dominique ARDAIL, MCU-PH, Faculté de Médecine Lyon-Sud

Examineurs : **Pascal REYNIER**, PU-PH, Université d'Angers
Stéphen Manon, DR, CNRS
François Paris, DR, INSERM

Directeur de Thèse : **François VALLETTE**, DR, INSERM

Remerciements

Je remercie le Dr. François Vallette de m'avoir accueilli dans son équipe et d'avoir encadré mon travail tout au long de ce projet. Je le remercie sincèrement pour sa confiance et la liberté qu'il m'a accordée même dans les moments de doute. Je remercie également le Dr. François Paris qui a participé activement à la gestion et à la réalisation de ce projet.

Je remercie le Dr. Olivier Cuvillier et le Dr. Dominique Ardail d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Merci également au Pr. Pascal Reynier et au Dr. Stephen Manon de prendre part au jury de thèse.

Je tiens à remercier les Dr Betty Gardie et Isabelle Corre qui ont dirigé mes stages de licence et de master. C'est en grande partie grâce (ou à cause) d'elles que j'en suis arrivé la.

Je tiens ensuite à remercier les personnes qui ont participé à la réalisation de ce projet. Un grand merci à Nolwenn Dubois qui m'a énormément aidé pour tous les dosages de lipides ainsi qu'à Shankar, Émeline et Fanny. Merci également à Claire et Kristell pour leur aide jusqu'au dernier moment.

Je remercie bien entendu l'ensemble de l'équipe 9 et en particulier Lisa pour son aide et ses conseils avisés. Merci également à Lisenn, Catherine, Pef, Christophe et Jean. Je n'oublie pas les autres étudiants de l'équipe que je remercie pour leur camaraderie et leur bonne humeur. Merci à Romain, Judith et les nouvelles, Marion, Cynthia, Charlotte.

Un très grand merci à Mazène pour son aide et ses conseils qui m'ont été d'une très grande utilité. Je tiens particulièrement à le remercier pour tout le temps qu'il m'a accordé et toutes nos conversations très enrichissantes (qu'elles soient scientifique ou non).

Merci à Quentin avec qui j'ai partagé mon bureau, mes pauses café et toutes nos blagues pourries pendant presque 3 ans. Merci également à Nourdine pour sa joie de vivre, son optimisme et sa néanmoins très grande lucidité...

Je remercie tous mes camarades du labo, Carole, Vincent, Denis, Julien et les autres pour leur soutien, leur amitié et les pauses café.

Enfin un très grand merci à mes deux amours. Tout d'abord Charline qui m'a supporté, aidé, aimé et bien plus pendant ces quatre dernières années. Et Léane qui n'aura assisté qu'au quatre derniers mois de la thèse et qui n'aura pas fait beaucoup d'effort pour nous laisser dormir mais que nous aimons quand même. Merci mes chéries, je vous aime

1 Apoptose	15
1.1 Généralités.....	15
1.2 Mécanismes effecteurs de l'apoptose	16
1.2.1 Les Caspases.....	16
1.2.2 Activation des Caspases	16
1.2.3 Mécanismes de destruction de la cellule	17
1.3 Voie extrinsèque de l'apoptose	18
1.4 Voie intrinsèque de l'apoptose (voie mitochondriale).....	20
1.4.1 Les protéines de la famille Bcl-2	20
1.4.2 Régulation de l'activité des protéines <i>BH3 only</i>	22
1.4.3 Activation de Bax et Bak	22
1.4.3.1 Modèle d'activation direct.....	23
1.4.3.2 Sensibilisation et dérégulation	23
1.4.3.3 Spécificité d'interaction entre les protéines de la famille Bcl-2.....	25
1.4.3.4 Changements conformationnels de Bax et Bak.....	26
1.4.4 Perméabilisation de la membrane mitochondriale.....	28
1.4.5 Implication des récepteurs mitochondriaux.....	30
1.5 Implication d'autres acteurs moléculaires	31
2 Lipides et apoptoses	32
2.1 Lipides récepteurs	34
2.1.1 Cholesterol.....	34
2.1.1.1 Effet anti-apoptotique de l'accumulation de Cholestérol membranaire	34
2.1.1.2 Interaction Cholestérol-Bax.....	35
2.1.2 Cardiolipin	36
2.1.2.1 Oxydation du cardiolipin et relargage du cytochrome c	36
2.1.2.2 Interaction Cardiolipin-protéines de la famille Bcl-2	36
2.1.3 Environnement lipidique et induction de l'apoptose.....	37
2.2 Lipides ligands.....	38
2.2.1 Prostaglandines	38
2.2.1.1 Prostaglandines et Cancer	38
2.2.1.2 Rôle pro-apoptotique du PGE2 intracellulaire (interaction avec Bax)	39

2.2.1.3 Rôle intracellulaire d'autres prostaglandines.....	40
2.2.1.4 Effet des prostaglandines sur la conformation de Bax	40
2.2.1.5 Régénération tissulaire et Repopulation tumorale	42
2.3 Sphingolipides	43
2.3.1 Synthèse <i>de novo</i> du céramide	43
2.3.2 Hydrolyse de la sphingomyéline	44
2.3.3 Métabolisme du céramide.....	44
2.3.4 Interactions entre le céramide et les protéines de la famille Bcl-2.....	45
2.3.5 Modèles d'induction de l'apoptose dépendante du couple céramide/Bax.....	46
2.3.6 Canaux céramide.....	47
2.3.7 Sphingosine-1-phosphate	48
2.3.8 Sphingolipides et communication RE - Mitochondrie	49
3 Contacts ER-Mitochondries : les MAM.....	51
3.1 Généralités.....	51
3.2 Liaisons protéiques entre le RE et la Mitochondrie	52
3.2.1 Chez la levure : le complexe ERMES	52
3.2.2 Dans la cellule animale	53
3.3 Implication des MAM dans les fonctions cellulaires	55
3.3.1 Synthèse des amino glycerophospholipides	55
3.3.2 Synthèse et métabolisme des sphingolipides.....	56
3.3.3 Homéostasie calcique.....	57
3.3.4 Morphologie et dynamique mitochondriale	58
3.3.4 Autophagie.....	59
3.4 Implication des MAM dans les pathologies humaines.....	60
3.4.1 Maladies neurodégénératives	60
3.4.1.1 Maladie de Batten.....	61
3.4.1.2 Maladie d'Alzheimer	61
3.4.1.3 Maladie de Parkinson	62
3.4.2 Infections virales.....	62
3.4.3 Pseudoxanthome élastique.....	63
3.4.4 Hypertention artérielle pulmonaire	63
3.4.5 Diabète de type 2	63
3.5 Implication des MAM dans l'apoptose.....	65

3.4.1	Nombre des contacts RE-Mitochondrie	65
3.4.2	Intensité (distance) des contacts RE-mitochondrie	66
3.4.3	Nature des contacts ER-mitochondrie (composition des MAM).....	66
4	Objectifs de la thèse	67
5	Matériel et méthodes.....	69
5.1	Culture cellulaire	69
5.2	Immunoblot	69
5.3	Test activité caspases	71
5.4	Microscopie.....	72
5.4.1	Immuno fluorescence.....	72
5.4.2	Mito tracker	72
5.4.3	Test de proximité par ligation <i>in situ</i> (P-LISA).....	72
5.4.4	Microscopie électronique.....	73
5.5	Invalidation de l'expression de protéines par shRNA	73
5.6	Fractionnement subcellulaire	74
5.6.1	Extraction des mitochondries à partir de cellules en culture.....	74
5.6.2	Extraction des mitochondries à partir de foies ou de cerveaux de souris	75
5.6.3	Purification des mitochondries et isolation des MAM.....	75
5.6.4	Purification du RE et du cytosol.	76
5.7	Dosage lipidique.....	77
5.7.1	Extraction des lipides.....	77
5.7.2	Purification des lipides	78
5.7.3	Analyse par UPLC-ESI-MS/MS.....	79
5.8	Analyses statistiques.....	81
6	Résultats	83
6.1	Caractérisation des MAM	83
6.1.1	Observation directe des MAM par MET	83
6.1.2	Mise au point d'une méthode de fractionnement subcellulaire	85
6.1.3	Analyse de la composition sphingolipidique des fractions	88
6.2	Modification des MAM au cours de l'apoptose	93
6.2.1	Induction de l'apoptose dans les U251.....	93
6.2.2	Modifications des profils sphingolipidiques des fractions subcellulaires au cours de l'apoptose.....	98

6.2.3 Redistribution des protéines de la famille Bcl-2 au cours de l'apoptose.....	103
6.2.4 Modifications des interactions protéiques au cours de l'apoptose.....	104
6.3 Rôle de Bax et Bak dans la synthèse des sphingolipides.....	106
7 Discussion et perspectives.....	115
7.1 Analyse de la composition des fractions	115
7.1.1 Distribution des marqueurs protéiques	115
7.1.2 Profils sphingolipidiques.....	116
7.1.2.1 Longueur de chaînes des céramides	116
7.1.2.2 Localisation du céramide	117
7.1.2.3 Formes glycosilées du céramide.....	119
7.2 Variation de la composition des fractions au cours de l'apoptose.....	120
7.2.1 Variation de la composition lipidique.....	120
7.2.1.1 Hydrolyse de la sphingomyéline dans les MAM ?	120
7.2.1.2 Autres variations lipidiques	121
7.2.2 Redistribution des protéines de la famille Bcl-2	122
7.2.2.1 Localisation des protéines à l'interface MAM-mitochondrie ?	123
7.2.2.2 Impact des modifications lipidiques	124
7.2.2.3 Mécanisme d'adressage des protéines dans les fractions	124
7.2.3 Modèle d'induction de l'apoptose.....	125
7.3 Quantification des interactions ER-Mitochondrie.....	126
7.4 Rôle de Bax et Bak dans la synthèse des sphingolipides.....	129
7.4.1 Perturbation de l'homéostasie cellulaire ?	129
7.5.2 Rôle direct ?	129
7.6 Implication dans les pathologies humaines.....	130
Bibliographie	141

Liste des abréviations

A1	Bcl-2-related protein 1
ABCC6	ATP-binding cassette sub-family C member 6
ADN	Acide désoxyribonucléique
ALL-697	Acute lymphoblastic leukemia - 697
AP-2 α	Activating enhancer binding protein 2 alpha
APAF-1	Adaptater molécule apoptosis protéase activating factor 1
aSMase	Acid sphingomyelinase
ATG5	Autophagy protein 5
ATG14	Autophagy protein 14
ATP	Adénosine triphosphate
BAD	Bcl-2 associated d
BAP31	B-cell receptor-associated protein 31
Bak	Bcl-2 associated k
Bax	Bcl-2 associated x
BC	Bcl-2 family BH3 and C terminus-binding groove
Bcl-2	B cell lymphoma 2
Bcl-w	B cell lymphoma w
Bcl-xl	B cell lymphoma extra large
BH	Bcl-2 homology
Bid	BH3-interacting domain death agonist
Bik	Bcl-2 interacting killer
BIM	Bcl-2 interacting médiateur of cell death
BSA	Bovine sérum albumine
bSMase	Bacterial sphingomyelinase
CAD	Caspase activated DNases
CARD	Caspase recruitment domain
CED-9	Cell-death abnormal 9
Cer	Céramide
CerS	Ceramide synthase

CERT	Ceramide transférase protein
CHOP	C/EBP homologous protein
CLN1	Neuronal ceroid lipofusinoze gene 1
CMV	Cytomégalovirus
Cox-1	Cyclooxygenase 1
Cox-2	Cyclooxygenase 2
CRAC	Cholesterol recognition amino acid consensus
DED	Death effector domain
DISC	Death inducing signaling complexe
DMEM	Dubelco modified Eagle's minimal essential medium
DRP1	Dynamin-related protein 1
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EGTA	Acide éthylène glycol tétraacétique
EIF2A	Eukaryote translation initiation factor 2A
EIF3	Eukaryote translation initiation factor 3
EIF4B	Eukaryote translation initiation factor 4B
EP receptor	Prostaglandine E receptor
ER	Endoplasmique réticulum
ERMES	ER-Mitochondria encounter structure
FADD	Fas-associated protein with death domain
FAPP2	Four-phosphate adaptator protein 2
Fas	Apoptosis stimulating fragment
FasR	Fas receptor
Fis 1	Mitochondrial fission 1 protein
FM	Fraction mitochondriale (fraction subcellulaire)
Foxo3A	Forkhead box O3
GIP	General insertion pore
GRP-75	Glucose-regulated protein 75 KDa
GTP	Guanosine triphosphate
H	Homogénat (fraction subcellulaire)
HCT116	Human colon tumor 116
HCV	Hepatitis C virus
LDL	High density lipoprotein

HEK293	Human Embryonic kidney 293
HeLa	Henrietta Lacks
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HEX	Héxadécéanal
HL-60	Human promyelocytic leukemia cells 60
HMG-CoA	3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A
HRK	Harakiri
HRP	Horseradish peroxidase
IP3R	Inositol 1,4,5-triphosphate receptor
LDL	Low density lipoprotein
MAM	Mitochondria associated membrane
MCF-7	Michigan cancer foundation-7
MCL-1	Myeloid cell leukemia-1
Mdm10	Mitochondrial distribution and morphology protein 10
Mdm12	Mitochondrial distribution and morphology protein 12
Mdm34	Mitochondrial distribution and morphology protein 34
Mfn1	Mitofusine 1
Mfn2	Mitofusine 2
Mmm1	Maintenance of mitochondrial morphology protein 1
Mnd	Motor neuron degeneration
MOMP	Mitochondrial outer-membrane permeabilization
MP	Mitochondries purifiées (fraction subcellulaire)
mPGES	Microsomal Prostaglandine S synthase
mPTP	Mitochondrial permeability transition pore
mTORC2	Target of rapamycin complex 2 subunit MAPKAP1
NFκB	Nuclear factor-kappa B
NGF	Nerve growth factor
Nogo-B	Neurite outgrowth inhibitor isoform B
Noxa	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 (« dommage » en latin)
NT-2	NTERA-2
nSMase	Neutral sphingomyelinase
PACS2	Phosphofurin acidic cluster sorting protein 2
PDGF	Platelet-derived growth factor

PBS	Phosphate buffer saline
p53	Protein 53kDa
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidylethanolamine
PGA2	Prostaglandine A2
PGD2	Prostaglandine D2
PGDS	Prostaglandine D synthase
PGE2	Prostaglandine E2
PGES	Prostaglandine E synthase
PGH2	Prostaglandine H2
PINK	PTEN-induced putative kinase protein 1
PLA2	Phospholipase A2
PS	Phosphatidylserine
PTPIP51	Protein-tyrosin phosphatase interacting protein 51
Puma	p53 upregulated modulator of apoptosis
PVDF	Polyvinylidene fluorure
RE	Réticulum endoplasmique (fraction subcellulaire)
ROCK1	Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase 1
RPP0	Ribosomal protein P0
S1P	Sphingosine-1-phosphate
siRNA	Small interfering RNA
SK	Sphingosine kinase
SMAC	Second mitochondria-derived activator of caspase
SMase	Sphingomyelinase
STING	Stimulator of interféron gene)
STS	Staurosporine
SVF	Sérum de veau fétal
tBid	Truncated BH3-interacting domain death agonist
TBS	Tris buffer saline
TIM	Translocase of the inner membrane
TM	Trans membranaire
TMZ	Témozolomide
TNF α	Tumor necrosis factor alpha

TNFR1	Tumor necrosis factor receptor 1
TOM	Translocase of the outer membrane
UV	Ultra-violet
UPLC-MS	Ultra-performance liquid chromatography-Mass spectrometry
VAPB	Vesicle-associated membrane protein-associated
VDAC	Voltage-dependant anion-selective channel protein 2
VIH	Virus de l'immunodéficience humain
VPR	Viral protein R

Première Partie

Introduction

1 Apoptose

1.1 Généralités

L'apoptose est un processus physiologique décrit pour la première fois en 1972 en tant que « mécanisme de contrôle de la mort cellulaire, actif, programmé et pouvant être initié ou inhibé par différents stimuli environnementaux » (Kerr et al., 1972).

Au niveau physiologique, l'apoptose permet un contrôle quantitatif et qualitatif des populations cellulaires. Elle est donc essentielle dans le maintien de l'homéostasie des tissus adultes, où elle s'oppose simplement à la mitose pour contrôler la population cellulaire et au cours du développement embryonnaire, où elle permet l'élimination ciblée de cellules. Lors du développement du système nerveux, les cellules ne pouvant établir de connexion synaptique fonctionnelle entrent en apoptose (Nijhawan et al., 2000). C'est également le cas des lymphocytes ayant développé une spécificité contre un auto-antigène lors du processus de sélection négative (Opferman and Korsmeyer, 2003).

Des défauts de régulation de l'apoptose sont impliqués dans de nombreuses pathologies telles que les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives, immunologiques (Elmore, 2007). C'est également un processus majeur en cancérologie. L'échappement à l'apoptose est considéré comme une des caractéristiques principales des cellules cancéreuses, entraînant l'accumulation d'aberrations génétiques et la progression tumorale (Hanahan and Weinberg, 2000).

On distingue deux voies cellulaires pouvant conduire à l'apoptose : la voie extrinsèque (ou voie des récepteurs de mort) et la voie intrinsèque (ou voie mitochondriale) (Figure 1). Ces deux voies de signalisation sont activées par des signaux d'origines différentes. La voie mitochondriale peut être induite par l'accumulation de dommages de l'ADN, des dérégulations des fonctions mitochondriales, l'hypoxie, des dérégulations des voies de signalisation intracellulaire induites par l'activation d'oncogènes, le manque de facteurs de survie ou l'infection virale (Evan and Littlewood, 1998). La voie extrinsèque est activée par la fixation d'un ligand pro-apoptotique sur un récepteur de mort à la surface

de la cellule. Ces deux voies de signalisation sont des senseurs du signal de mort cellulaire, elle sont partiellement interconnectées et convergent vers un mécanisme effecteur commun : l'activation des caspases (Figure 1).

1.2 Mécanismes effecteurs de l'apoptose

1.2.1 Les Caspases

L'apoptose est caractérisée par une série d'altérations morphologiques et biochimiques qui s'enchainent selon un schéma hautement conservé entre les différents types cellulaires. Au niveau morphologique, l'apoptose est caractérisée par la condensation et la fragmentation de la chromatine, la condensation des organelles, la dilatation du réticulum endoplasmique, la diminution du volume cellulaire et des altérations de la membrane plasmique permettant la reconnaissance et la phagocytose des cellules apoptotiques et limitant ainsi la réponse inflammatoire. Cette observation a très tôt laissé supposer qu'il existait un mécanisme commun d'exécution de l'apoptose (Kerr et al., 1972).

Cette cascade d'évènements entraînant la destruction de la cellule est assurée par une famille de cystéine-protéase : les caspases. Ce nom est issu de la contraction du « c » pour « Cystéine-Protéase » et de « aspase » pour désigner la capacité de ces enzymes à cliver après un résidu d'acide aspartique (Cohen, 1997).

Les caspases 3, 6, 7, 8 et 9 sont impliquées dans l'apoptose. On distingue les caspases initiatrices (8 et 9) et les caspases exécutrices (3, 6 et 7). Les autres caspases sont principalement impliquées dans la réponse inflammatoire.

1.2.2 Activation des Caspases

Les caspases sont synthétisées sous formes de procaspases monomériques inactives. Leur activation nécessite un clivage et/ou une dimérisation. L'assemblage en dimères est facilité par l'intervention de protéines adaptatrices qui se lient à des régions spécifiques des prodomaines. Il s'agit du domaine CARD (*Caspase Recruitment Domain*) pour les caspases 1, 2, 4, 5 et 9 et du domaine DED (*Death Effector Domain*) pour les caspases 8 et 10 (McIlwain et al., 2013).

En ce qui concerne les caspases initiatrices, les procaspases monomériques sont activées par dimérisation entraînant un clivage autocatalytique.

Pour les caspases exécutrices, les procaspases sont déjà dimériques et elles sont activées par clivage par les caspases initiatrices. Le clivage entraîne un changement conformationnel du dimère qui devient alors une protéase mature fonctionnelle (Riedl and Shi, 2004). Une fois activées, les caspases exécutrices peuvent cliver et activer d'autres caspases provoquant ainsi une boucle d'amplification.

1.2.3 Mécanismes de destruction de la cellule

Comme il a déjà été dit précédemment, l'entrée d'une cellule en apoptose entraîne une série d'altérations morphologiques rapides. La cellule commence par s'arrondir et se rétracter, la surface cellulaire présente de nombreux bourgeonnements de la membrane (*blebbing*) qui se détachent ensuite pour former les corps apoptotiques. Le noyau se condense et se fragmente alors que l'ADN subit une hydrolyse massive. L'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique et le réseau mitochondrial sont fragmentés. Ces altérations morphologiques sont dues à la protéolyse de centaines de protéines par les caspases (Lüthi and Martin, 2007). On peut parler ici de véritable destruction cellulaire puisque l'ensemble des structures et des fonctions de la cellule sont dégradées (Taylor et al., 2008)

- Les principaux composants du cytosquelette sont détruits. Les caspases ciblent des protéines des filaments d'actine (actine, myosine, spectrine α gelsoline, filamine), des microtubules (tubuline) et des filaments intermédiaires (vimentine, kératine et les lamines nucléaires).
- L'enveloppe nucléaire et le noyau sont fragmentés suite à la protéolyse des lamines (Rao et al., 1996) et de différentes protéines de l'enveloppe nucléaire. La fragmentation du noyau est également due à des contractions des faisceaux d'actine suite au clivage et à l'activation de la protéine ROCK1 par les caspases.
- L'ADN est fragmenté par les CAD (Caspase Activated DNases). Ces DNases sont activées suite à leur clivage par les caspases (Nagata, 2000). La fragmentation de l'ADN est une des caractéristiques majeures de l'apoptose, largement utilisée en tant qu'outil de détection des cellules apoptotiques. Pourtant cette fragmentation de l'ADN n'est pas indispensable ni à la mort cellulaire ni à la phagocytose des cellules

après l'apoptose. Elle permet cependant de largement limiter la réponse inflammatoire ou auto-immune (Degen et al., 2000).

- De nombreux composants des systèmes de transcription et traduction sont dégradés. Les caspases clivent des facteurs de transcription (AP-2 α , BTF3, NF κ B...), des facteurs d'initiation de la traduction (EIF2a, EIF3, EIF4B...) et des protéines ribosomales (RPP0 et p70S6K) (Lüthi and Martin, 2007).

Enfin, les cellules à un stade avancé de l'apoptose sont éliminées par phagocytose grâce à l'apparition de signaux particuliers à la surface cellulaire (*Eat Me Signals*). On peut citer parmi ces signaux l'exposition de phosphatidylserine (Fadok et al., 1998) ou des modifications de la glycosylation de la membrane plasmique reconnues par les lectines des phagocytes.

1.3 Voie extrinsèque de l'apoptose

La voie extrinsèque de l'apoptose est particulièrement impliquée dans la régulation des fonctions du système immunitaire. On peut citer comme exemples l'élimination des lymphocytes auto-réactifs, la destruction de cellules infectées ou cancéreuses par les lymphocytes cytotoxiques ou encore l'inhibition de la réponse immunitaire une fois l'agent pathogène éliminé (Opferman and Korsmeyer, 2003)

L'initiation de la voie extrinsèque de l'apoptose implique des récepteurs transmembranaires de la superfamille des récepteurs au TNF. Ces récepteurs possèdent un domaine extracellulaire riche en cystéines impliqué dans la fixation du ligand (Gruss and Dower, 1995) et un domaine cytosolique d'environ 80 acides aminés appelé domaine de mort (Ashkenazi and Dixit, 1998; Tartaglia et al., 1993). Le domaine de mort est responsable de la transmission du signal de mort depuis la surface de la cellule jusqu'aux voies de signalisation intracellulaire. Plusieurs couples ligand/récepteur de mort ont été identifiés mais les mieux caractérisés sont FasL/FasR (CD95) et TNF α /TNFR1. Dans le modèle d'activation de CD95, les récepteurs sont pré-associés à la membrane plasmique sous la forme d'homotrimères. La liaison du ligand (homotrimère également) modifie la conformation du récepteur et de son domaine de mort intracellulaire, induisant l'oligomérisation des domaines de mort et le recrutement de la protéine adaptatrice FADD (*Fas-Associated protein with Death Domain*) via son propre

domaine de mort (Scott et al., 2009). La liaison de FADD entraîne son oligomérisation (Muppidi et al., 2006) et la liaison des pro-caspases 8 et 10 pour former le complexe DISC (*Death Inducing Signaling Complex*) (Kischkel et al., 1995). FADD et la caspase 8 interagissent *via* leurs domaines DED. Les caspases 8 et 10 vont alors s'auto-cliver et être libérées dans le cytosol sous leur forme active où elles entraînent l'activation des caspases exécutrices et l'entrée de la cellule en apoptose (Figure 1) (Ashkenazi and Dixit, 1998).

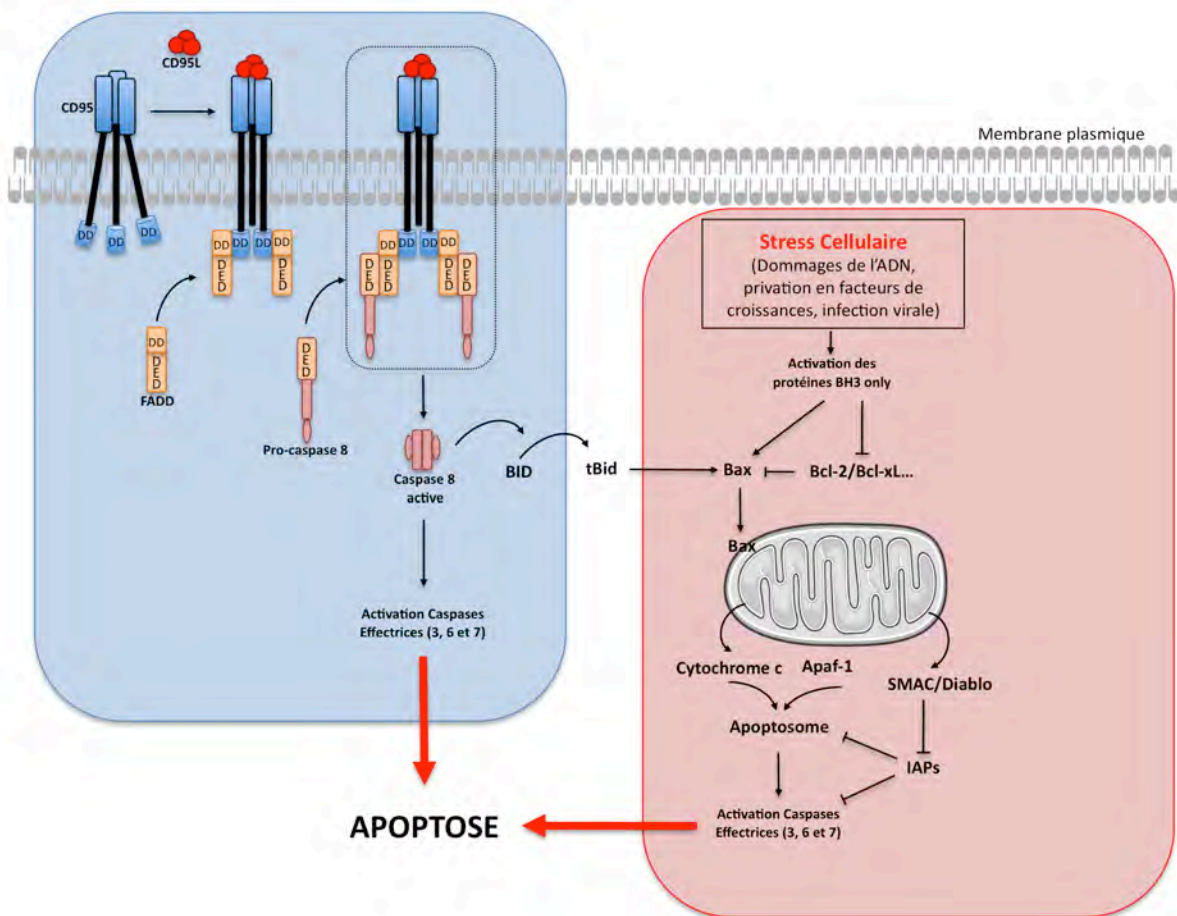


Figure 1 : Voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose.

La voie intrinsèque de l'apoptose (à droite) implique l'activation des protéines *BH3 only* par différents stress cellulaires. Ces protéines vont alors inhiber les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et activer les pro-apoptotiques effecteurs Bax et Bak. L'activation de Bax et Bak induit la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe ou MOMP (*Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*) et le relargage de facteurs pro-apoptotiques dans le cytosol. Parmi ces facteurs pro-apoptotiques, Apaf-1 et le cytochrome c forment avec la pro-caspase 9 un complexe appelé apoptosome qui va permettre l'activation des caspases effectrices et l'apoptose. La voie extrinsèque de l'apoptose (à gauche) est activée par la fixation d'un ligand sur un récepteur de mort. Cette fixation entraîne l'oligomérisation des domaines de mort (DD), la fixation de la protéine FADD puis le recrutement et l'activation de la caspase 8. Une fois activée, la caspase 8 active des caspases effectrices et l'apoptose. La caspase 8 induit également le clivage de Bid en tBid (forme active) qui va activer Bax et donc la voie intrinsèque de l'apoptose. Cette connexion entre la voie extrinsèque et la voie mitochondriale permet ainsi d'amplifier le mécanisme apoptotique.

1.4 Voie intrinsèque de l'apoptose (voie mitochondriale)

Contrairement à la voie des récepteurs de mort et comme son nom l'indique, la voie intrinsèque de l'apoptose est induite par des stimuli intracellulaires cytotoxiques (dommages de l'ADN, infection virale, privation en facteurs de croissances) (Evan and Littlewood, 1998). La régulation de la voie intrinsèque de l'apoptose est assurée par les protéines de la famille Bcl-2. Ces protéines se divisent en deux groupes, pro- ou anti-apoptotique, et forment un réseau complexe d'interactions.

La voie intrinsèque est également appelée voie mitochondriale de l'apoptose car elle repose sur la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale et la libération dans le cytosol de facteurs pro-apoptotiques de l'espace intermembranaire induisant l'activation des caspases (Figure 1).

1.4.1 Les protéines de la famille Bcl-2

La protéine Bcl-2 est la première protéine de cette famille à être identifiée, en 1985, en tant que proto-oncogène dans les lymphomes folliculaires (Tsujimoto et al., 1985).

Le gène codant la protéine Bcl-2 se situe sur le chromosome 18. Dans 85 % des lymphomes folliculaires, on observe une translocation des chromosomes 14 et 18. Suite à cette translocation, le gène Bcl-2 se retrouve sous le contrôle du promoteur du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines ce qui entraîne une surexpression de la protéine Bcl-2 et une forte inhibition de l'apoptose (Korsmeyer, 1992; McDonnell et al., 1989).

L'homologie des protéines de la famille Bcl-2 se situe au niveau des domaines BH (*Bcl-2 homology domains*) (Figures 3) qui sont impliqués dans les modifications post-traductionnelles et dans les interactions protéine-protéine (Borner et al., 1994; Farrow and Brown, 1996; Lutz, 2000; Yin et al., 1994).

On peut établir un classement fonctionnel des protéines de la famille Bcl-2 en quatre groupes (Chipuk et al., 2010) :

- Les protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, MCL1 et A1). Ces protéines contiennent les domaines BH 1, 2, 3 et 4. Elles sont localisées dans le cytosol mais peuvent également être intégrées au niveau de la membrane externe mitochondriale ou du réticulum dans différentes proportions. Dans des conditions non apoptotiques, ces protéines préservent l'intégrité de la membrane

mitochondriale externe en inhibant directement les protéines pro-apoptotiques effectrices.

- Les protéines pro-apoptotiques effectrices (Bax et Bak). L'activation de ces protéines entraîne leur oligomérisation en pores protéolipidiques au niveau de la membrane externe mitochondriale pour induire la perméabilisation de cette membrane et la libération de facteurs pro-apoptotiques dans le cytosol.
- Les protéines pro-apoptotiques activatrices directes (Bid et Bim) sont capables d'activer Bax et Bak.
- Les protéines pro-apoptotiques de dérégulation ou sensibilisation (Bad, Bik, Bmf, HRK, Noxa et Puma) se fixent sur les protéines anti-apoptotiques pour les inhiber.

Les protéines pro-apoptotiques (activatrices directes et de dérégulation) ne contiennent que le domaine BH3 et sont également appelées protéines *BH3 only*.

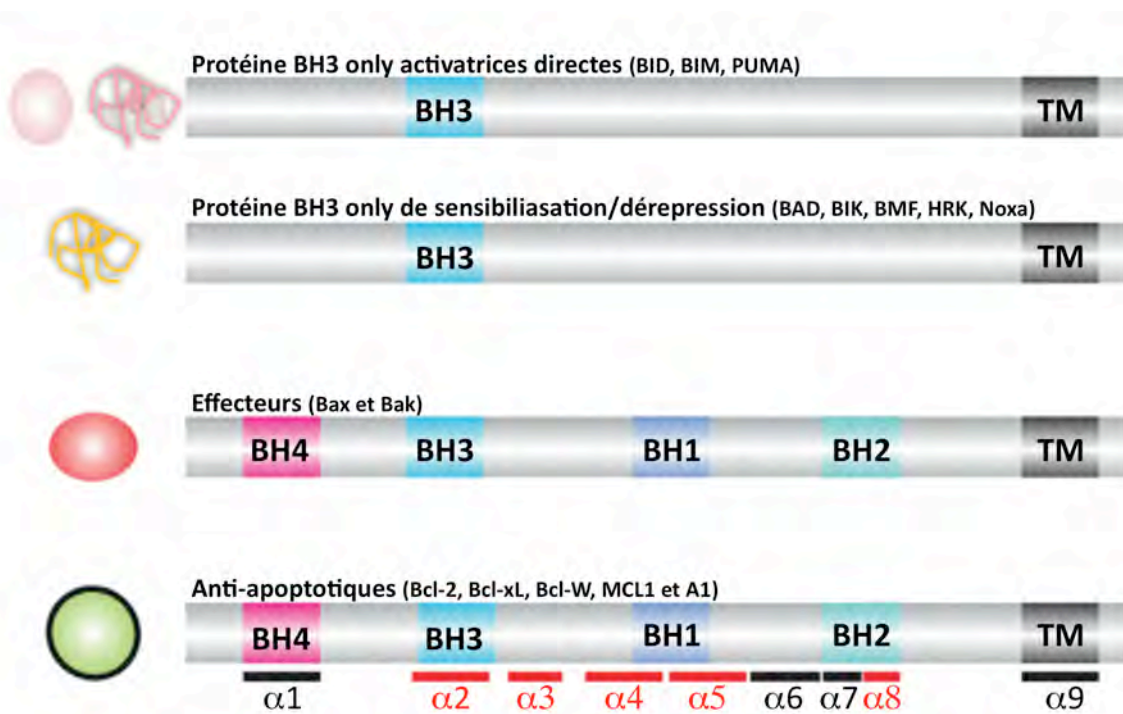


Figure 2 : Représentation schématique des protéines de la famille Bcl-2 classées en quatre groupes. Les positions des domaines BH1 à 4, des régions transmembranaires (TM) et des hélices α sont représentées. Les protéines anti-apoptotiques et les protéines pro-apoptotiques effectrices contiennent les domaines d'homologie BH1 à 4. Les codes de formes et de couleurs présents sur la gauche de la figure sont conservés dans la figure 3. D'après Moldoveanu et al. 2014 « *Many players in Bcl-2 family affairs* ». *Trends in Biochemical Sciences*.

1.4.2 Régulation de l'activité des protéines *BH3 only*

La voie mitochondriale de l'apoptose est régulée par le réseau complexe d'interactions des protéines de la famille Bcl-2. Au sein de ce réseau les protéines *BH3 only* jouent le rôle de senseurs des signaux de mort intracellulaires.

Les signaux de mort peuvent induire une augmentation de l'expression des protéines *BH3* *via* des facteurs de transcriptions. La protéine p53 induit l'expression de NOXA et PUMA en réponse aux dommages de l'ADN (Nakano and Vousden, 2001; Oda et al., 2000). BIM est induit par FOXO3A en réponse à la privation en facteurs de croissance (Dijkers et al., 2000) et par CHOP (*C/EBP homologous protein*) en réponse au stress du réticulum endoplasmique (Puthalakath et al., 2007).

Les signaux de mort peuvent également induire l'activation des protéines *BH3 only* par des modifications post-traductionnelles. BAD est activé par déphosphorylation en réponse à la privation en facteurs de croissance (Zha et al., 1996). Bid est activé suite à son clivage par la caspase 8. La forme clivée active est appelée tBid (Li et al., 1998; Luo et al., 1998). L'activité de BIM est régulée *via* sa séquestration par des structures du cytosquelette. Dans les cellules saines BIM est lié aux complexes dynéines des microtubules. En réponse au rayonnement UV ou à un traitement au taxol, BIM est libéré sous forme active dans le cytosol (Puthalakath and Strasser, 2002).

1.4.3 Activation de Bax et Bak

Dans des conditions apoptotiques, les protéines *BH3 only* actives sont capables d'induire l'activation des effecteurs Bax et Bak suivant deux modèles : l'activation directe et la sensibilisation/dérépression (Figure 3).

L'activation de Bax induit un changement conformationnel permettant son adressage à la mitochondrie et son oligomérisation au niveau de la membrane mitochondriale, la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe, le relargage dans le cytosol de facteurs pro-apoptotiques, l'activation des caspases et la mort de la cellule.

1.4.3.1 Modèle d'activation direct

Au moins deux protéines *BH3 only* sont capables d'induire de façon directe l'activation des effecteurs Bax et Bak. Il s'agit de BID (*Bcl-2 interacting domain death agonist*) et BIM (*Bcl-2 interacting médiateur of cell death*) (Chipuk et al., 2010).

La forme active de BID est capable d'induire l'oligomérisation de Bax et Bak, la perméabilisation de la membrane mitochondriale et le relargage de cytochrome c (Kuwana et al., 2002; Wei et al., 2000). Il a été montré que la protéine BIM est capable d'induire l'apoptose *via* le même modèle (Kim et al., 2009; Marani et al., 2002). L'action de BID et BIM est due à leur domaine BH3 qui peut être qualifié de sous-unité fonctionnelle des protéines *BH3 only*. Les domaines BH3 (ou peptides BH3) de BID et BIM sont d'ailleurs suffisants pour induire l'oligomérisation de Bax et Bak et la formation de pores sur des mitochondries isolées et des liposomes (Figure 3) (Kuwana et al., 2002, 2005; Letai et al., 2002).

Le rôle de BID et BIM peut paraître redondant. Cependant il a été montré que BID active préférentiellement Bak alors que Bim active préférentiellement Bax (Sarosiek et al., 2013a).

1.4.3.2 Sensibilisation et dérépression

Les autres protéines *BH3 only* (BAD, BIK, HRK et Noxa) n'activent pas directement Bax et Bak mais sont capables de se lier aux protéines anti-apoptotiques pour les inhiber (Figure 3) (Chen et al., 2005; Chipuk et al., 2008). Chaque protéine *BH3 only* présente un profil de liaison spécifique avec les protéines anti-apoptotiques. Ainsi, Bad peut se lier à Bcl-2, Bcl-xL et Bcl-w alors que Noxa par exemple se lie à Mcl-1 et A1 (Chen et al., 2005).

On distingue deux modèles d'action pour ces protéines. Dans le modèle de sensibilisation, les protéines *BH3 only* se fixent à une protéine anti-apoptotique et l'inhibent ce qui sensibilise la cellule au prochain stress cellulaire. Ce modèle augmente la sensibilité de la cellule à l'apoptose mais ne peut induire l'apoptose par lui-même.

Dans le modèle de dérépression, lors d'un stress cellulaire les protéines activatrices directes sont séquestrées par les protéines anti-apoptotiques. Les protéines de dérépression vont alors se lier aux anti-apoptotiques et libérer les activatrices directes qui vont activer Bax et Bak et induire l'apoptose (Chipuk et al., 2010).

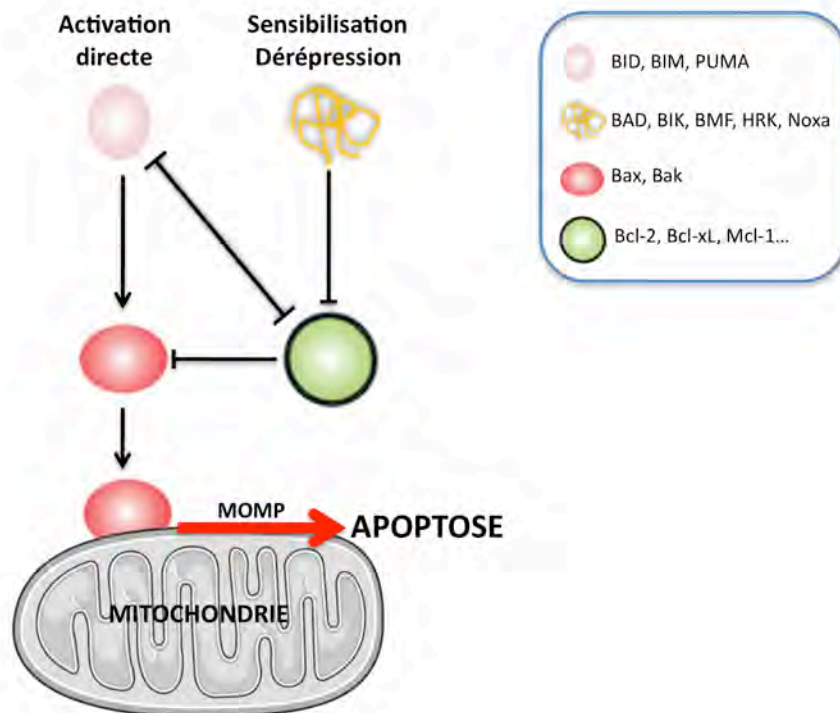


Figure 3 : Schéma simplifié du réseaux d'interactions des protéines de la famille Bcl-2.

Les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Mcl-1, Bcl-2, Bcl-xL, etc.) exercent une inhibition constitutive sur les protéines pro-apoptotiques effectrices (Bax et Bak) et sur les protéines *BH3 only* activatrices directes (BIM, BID et PUMA). Une fois activées, les protéines *BH3 only* peuvent induire l'activation de Bax et Bak *via* deux modèles différents. Les protéines *BH3 only* activatrices directes sont capables d'activer directement Bax et Bak pour induire la MOMP et l'apoptose. Les protéines *BH3 only* de sensibilisation et/ou de dérégulation inhibent les protéines anti-apoptotiques. Adapté d'après Moldoveanu et al. 2014 « *Many players in Bcl-2 family affairs* ». *Trends in Biochemical Sciences*.

Le rôle d'activation strictement directe ou indirecte (sensibilisation/dérégulation) de certaines protéines *BH3 only* peut être discuté. Par exemple, la protéine *BH3 only* PUMA est bien capable d'induire l'activation de Bax mais les données présentes dans la littérature sur le type d'activation sont parfois contradictoires. PUMA est ainsi souvent classée parmi les activateurs indirects pour sa capacité à fixer et inhiber l'ensemble du répertoire des Bcl-2 anti apoptotique (Chen et al., 2005; Chipuk et al., 2008; Kuwana et al., 2005). Des études ont montré que PUMA est également capable de se lier à Bax (*via* l'interaction du domaine BH3 de PUMA et de l'hélice $\alpha 1$ de Bax), d'induire son changement conformationnel et son adressage à la mitochondrie (Cartron et al., 2004; Kim et al., 2009).

D'autre part, les activateurs directs BID et BIM sont également capables de se lier à l'ensemble du répertoire des Bcl-2 anti-apoptotiques pour les inhiber (Chen et al., 2005). Il paraît donc important de nuancer le caractère strict des modèles d'activations directs

et indirects des protéines *BH3 only*. On peut cependant parler de profil d'action davantage orienté vers l'activation directe ou indirecte (Kuwana et al., 2005).

1.4.3.3 Spécificité d'interaction entre les protéines de la famille Bcl-2

Les protéines de la famille Bcl-2 contiennent une structure particulière nommée sillon BC (*Bcl-2 family BH3 and C terminus-Binding groove*). Il s'agit d'un sillon hydrophobe situé entre les hélices $\alpha 2$ et 5. Cette structure est impliquée dans les interactions entre les protéines de la famille Bcl-2. Le domaine BH3 des protéines *BH3 only* se fixe sur le sillon BC des protéines anti-apoptotiques pour les inhiber ou sur le sillon BC des effecteurs pour les activer. C'est d'ailleurs les caractéristiques structurales des différents sillons BC et des différents domaines BH3 qui sont à l'origine de la spécificité d'interaction entre les protéines de la famille Bcl-2 (Moldoveanu et al., 2014) (Figure 4).

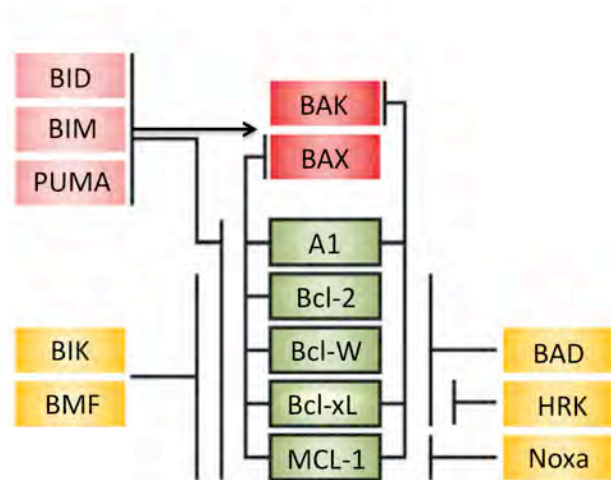


Figure 4 : Réseau d'interactions préférentiels des protéines de la famille Bcl-2.

Les protéines de la famille Bcl-2 interagissent entre elles au sein d'un réseau complexe qui permet la régulation de la voie mitochondriale de l'apoptose. Ces interactions reposent sur les rôles fonctionnels de ces protéines déjà commentés dans la figure 3 (le code couleur est conservé). Cependant, il existe également une spécificité d'interactions plus ou moins préférentielles entre ces protéines. Cette spécificité est due à la complémentarité structurale entre le domaine BH3 d'une protéine et le sillon BC de ces partenaires potentiels. D'après Moldoveanu et al. 2014 « *Many players in Bcl-2 family affairs* ». *Trends in Biochemical Sciences*.

1.4.3.4 Changements conformationnels de Bax et Bak

Dans les cellules saines, les protéines Bax et Bak sont présentes sous forme inactive. Bak est présent constitutivement à la membrane mitochondriale externe tandis que Bax est cytosolique. Cette différence de localisation s'explique par une différence de conformation.

Les protéines de la famille Bcl-2 ciblent la membrane mitochondriale externe *via* une hélice α située en région C-terminale, l'hélice α_9 ou région TM (Trans Membranaire) (Figure 2). Si cette hélice α est exposée la protéine exerce un ciblage constitutif de la mitochondrie, c'est le cas de Bak. Pour la protéine Bax, l'hélice α_9 est logée dans le sillon BC. Bax est donc présent dans le cytosol sous sa forme inactive. Il faut une première étape d'activation pour que Bax cible la mitochondrie.

Le mode d'action des protéines *BH3 only* repose normalement sur la fixation de leur domaine BH3 sur le sillon BC de leur protéine cible. Le sillon BC de Bax n'est cependant pas accessible puisqu'il est occupé par l'hélice α_9 . La première étape de l'activation de Bax est donc permise par une interaction non canonique entre le domaine BH3 de BID ou BIM et une région de Bax située entre les hélices α_1 et 6 (Gavathiotis et al., 2008)(Gavathiotis et al., 2008)(Gavathiotis et al., 2008)(Gavathiotis et al., 2008)⁴⁸(Gavathiotis et al., 2008)(Gavathiotis et al., 2008)(Cartron et al., 2003, 2004; Gavathiotis et al., 2008). On parle ici d'interaction « *Hit and Run* » pour qualifier son caractère transitoire (Figure 5). Cette première étape permet le déplacement de l'hélice α_9 de Bax qui devient exposée permettant ainsi l'adressage de Bax à la mitochondrie (Lalier et al., 2007a).

Cette conformation de Bax permet son adressage à la mitochondrie mais n'est pas suffisante pour induire la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe, on parle ainsi de conformation dormante. Dans les cellules saines Bax est d'ailleurs rétrotransloqué en permanence de la membrane mitochondriale vers le cytosol par Bcl-xL (Edlich et al., 2011).

Ensuite les mécanismes d'activation de Bax et Bak sont très proches et nécessitent la fixation du domaine BH3 de BID ou BIM dans le sillon BC de Bax ou Bak (Kim et al., 2009; Wei et al., 2000). Cette interaction entraîne un changement conformationnel important de Bax et Bak. La structure normalement globulaire de ces deux protéines

subit une sorte de dépliement permettant la séparation de deux domaines distincts (« Latch » et « Core ») (Brouwer et al., 2014). La protéine *BH3 only* est ensuite détachée ce qui permet la libération du sillon BC. Bax et Bak vont alors pouvoir s'organiser en homodimères symétriques : chaque monomère engageant son domaine BH3 dans le sillon BC de l'autre monomère (Czabotar et al., 2013). Enfin, les homodimères vont s'oligomériser *via* l'interaction de leurs hélices α_6 et entraîner la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (Dewson et al., 2009; Ma et al., 2013) (Figure 5).

Il est important de préciser que le modèle d'activation de Bax qui vient d'être présenté ici n'est pas unanimement accepté. Ce modèle repose notamment sur des études structurales de cristallographie qui présentent certaines limites techniques dont l'utilisation de protéines recombinantes produites par des bactéries et souvent mutées ou tronquées.

En particulier, le rôle de l'hélice α_9 dans l'insertion de Bax au niveau de la membrane mitochondriale peut être remis en cause. Des études ont par exemple montré que Bax peut s'insérer dans la membrane mitochondriale malgré la délétion de sa partie C-terminale contenant l'hélice α_9 (Antonsson et al., 2000; Cartron et al., 2003).

Des travaux réalisés au laboratoire permettent de proposer un modèle légèrement différent concernant les premières étapes de l'insertion de Bax dans la membrane mitochondriale. Ces travaux montrent l'importance de l'hélice α_1 lors de l'insertion de Bax (Bellot et al., 2007; Cartron et al., 2003, 2008). L'hélice α_1 permet l'adressage de Bax à la mitochondrie via son association avec TOM22. Dans un second temps, TOM40 permet l'insertion de Bax dans la membrane mitochondriale (les rôles des récepteurs mitochondriaux et du complexe TOM sont discutés dans les paragraphes suivant).

Il semble donc que l'insertion de Bax dans la membrane mitochondriale puisse avoir lieu *via* plusieurs mécanismes différents, en fonction de la cinétique du processus apoptotique et de l'intensité du signal pro-apoptotique. A un stade précoce de l'apoptose, l'insertion de Bax est permise par l'interaction de TOM22 et de l'hélice α_1 de Bax. A un stade plus avancé, un pool de Bax déjà inséré dans la membrane mitochondriale est également capable de jouer le rôle de récepteur pour les molécules de Bax encore cytosoliques entraînant une amplification de l'adressage de Bax à la mitochondrie (Cartron et al., 2008).

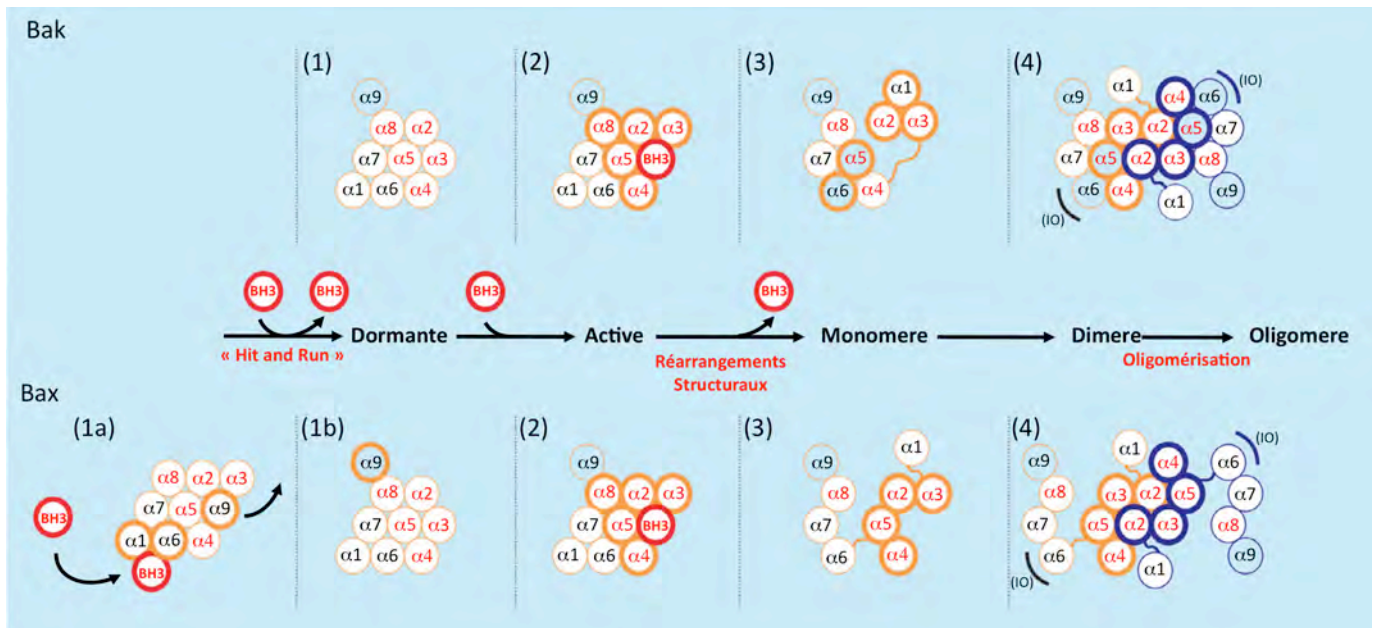


Figure 5 : Changements conformationnels de Bax et Bak au cours de leur activation.

Dans les cellules saines, Bax est localisé au niveau du cytosol (1a). Son activation par les protéines *BH3 only* se fait en deux étapes. La première étape est caractérisée par l'interaction non canonique du domaine BH3 de Bid ou BIM sur une région de Bax située entre les hélices $\alpha 1$ et 6 . Cette interaction est très transitoire et est qualifiée de « *Hit and Run* ». Bax subit alors un premier changement de conformation qui permet l'exposition de son hélice $\alpha 9$ et donc son adressage à la membrane externe de la mitochondrie (1b). La seconde étape d'activation est commune pour Bax et Bak. Le domaine BH3 d'une protéine *BH3 only* activatrice directe se fixe sur le sillon BC (entre les hélices $\alpha 1$ et 5) de Bax ou Bak (2). On observe alors un nouveau changement de conformation modifiant profondément la structure tridimensionnelle de Bax et Bak. Leur structure jusqu'ici sous la forme d'un noyau unique, se sépare en deux groupes ou « pelotes » distincts (3). Ces monomères s'organisent alors en dimères actifs (4). Les hélices $\alpha 6$ et 7 faisant office d'interface d'oligomérisation (IO) permettent la formation d'oligomères à l'origine de la formation de pores protéiques ou protéolipidiques et de la MOMP. D'après Moldoveanu et al. 2014 « *Many players in Bcl-2 family affairs* ». *Trends in Biochemical Sciences*.

1.4.4 Perméabilisation de la membrane mitochondriale

La perméabilisation de la membrane mitochondriale externe est donc finement régulée par le réseau d'interaction des protéines de la famille Bcl-2. C'est une étape clé de l'apoptose, permettant le relargage de facteurs pro-apoptotiques dans le cytosol et l'activation des caspases. Elle est souvent considérée comme le point de non retour de l'entrée en apoptose. Mais les mécanismes moléculaires précis à l'origine de la perméabilisation de la membrane mitochondriale induite par Bax et Bak sont longtemps restés méconnus. Ainsi plusieurs modèles ont été proposés durant ces vingt dernières années (Er et al., 2006).

On a d'abord considéré la perméabilisation de la mitochondrie comme étant la conséquence d'une rupture non spécifique de la membrane externe suite au gonflement

de la matrice mitochondriale. Des études menées à la fin des années 90 montraient que Bax entraîne une perte du potentiel membranaire mitochondrial, le gonflement des mitochondries et le relargage du cytochrome c (Narita et al., 1998; Zamzami et al., 1996). Dans ces études l'effet de Bax peut être inhibé par la cyclosporine A et l'acide bongkrekc, des inhibiteurs des mPTP (canaux de perméabilité des mitochondries). A cette époque, l'activité de perméabilisation de Bax et Bak a donc été associée à l'ouverture des mPTP. Il a ainsi été montré que des protéines de la famille Bcl-2 pouvaient agir sur l'activité des mPTP *via* des interactions directes avec VDAC, un des composants des mPTP au niveau de la membrane externe mitochondriale (Marzo et al., 1998; Narita et al., 1998; Shimizu et al., 1999; Tsujimoto and Shimizu, 2002).

Ce modèle a cependant été remis en cause par certaines études montrant que le relargage de cytochrome c peut avoir lieu *in vivo* sans gonflement des mitochondries (De Giorgi et al., 2002) ni perte du potentiel membranaire (Bossy-Wetzel et al., 1998; Jürgensmeier et al., 1998). De plus, Bax est capable de s'organiser en oligomères au niveau de la membrane externe mitochondriale et d'induire le relargage de cytochrome c sans interagir avec VDAC (Antonsson et al., 2001; Kuwana et al., 2002; Mikhailov et al., 2001).

Le modèle de perméabilisation de la membrane mitochondriale externe communément admis aujourd'hui repose sur la capacité de Bax et Bak à s'oligomériser au niveau de la membrane externe de la mitochondrie pour former des pores suffisamment larges pour permettre le relargage de facteurs pro-apoptotiques (Figure 5). Dans ce modèle, les oligomères de Bax ou Bak constituent eux-mêmes des pores protéiques (ou protéolipidiques). Bax est d'ailleurs capable d'induire la perméabilisation de liposomes *in vitro* et donc nécessairement sans interagir avec aucune autre protéine (Antonsson et al., 2001). D'autres protéines de la famille Bcl-2 (Bcl-xL et Bcl-2) sont également capables de former des canaux dans des bicouches lipidiques mais uniquement à des pH acides non physiologiques. Les protéines de la famille Bcl-2 présentent des similitudes structurelles avec des toxines bactériennes, en particulier la toxine diphtérique et les colicines (Muchmore et al., 1996). Ainsi la formation de canaux par les protéines de la famille Bcl-2 a été comparée au modèle déjà décrit des toxines bactériennes. Ces toxines agissent en trois étapes : association à la membrane, intégration des hélices $\alpha 5$ et $\alpha 6$ dans la bicouche lipidique et homodimérisation ou oligomérisation entraînant la

formation de canaux (Schendel et al., 1997). Dans des conditions physiologiques, Bax et Bak sont les seules protéines de la famille Bcl-2 capables de former de tels canaux.

Bax et surtout des oligomères de Bax sont capables de déstabiliser des bicouches phospholipidiques et de former des canaux, observables en microscopie électronique (Epanand et al., 2002) et surtout de tailles suffisantes (autour de 22 Å) pour permettre le relargage de cytochrome c (Basañez et al., 1999; Saito et al., 2000).

Ce modèle reposant sur la formation de canaux au niveau de la membrane mitochondriale externe et de plus compatible avec l'observation de membrane mitochondriale interne intacte et fonctionnelle après le relargage de cytochrome c.

1.4.5 Implication des récepteurs mitochondriaux

Bien que l'insertion de Bax au niveau d'une membrane lipidique puisse avoir lieu *in vitro* sans l'intervention de récepteurs, des études laissent supposer que dans des conditions physiologiques, différentes protéines facilitent l'adressage et l'insertion de Bax au niveau de la membrane mitochondriale externe. C'est par exemple le cas de différentes protéines de la famille Bcl-2. Il a été montré que lors de l'apoptose tBid se lie rapidement à la membrane mitochondriale où il interagit avec Bax pour faciliter son recrutement et son insertion dans la membrane (Lovell et al., 2008).

Plus de 90 % des protéines mitochondriales sont codées par l'ADN nucléaire, synthétisées dans le cytosol et doivent donc ensuite être importées au niveau de la mitochondrie. Cette fonction est assurée par les TOM (*Translocase of the Outer Membrane*) et les TIM (*Translocase of the Inner Membrane*). Le complexe TOM est composé d'un pore principal GIP (*General Insertion Pore*) principalement composé de TOM40 et TOM22, auxquels TOM20 et TOM70 peuvent s'associer de façon transitoire (Neupert and Herrmann, 2007). Différentes études se sont intéressées au rôle de cette machinerie d'importation mitochondriale au cours de l'apoptose et ont montré que différentes protéines de la famille Bcl-2 peuvent interagir avec des protéines du complexe TOM (Petit et al., 2009). C'est par exemple le cas des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Mcl-1 qui interagissent respectivement avec TOM20 (Motz et al., 2002; Schleiff et al., 1997) et TOM70 (Chou et al., 2006).

Des travaux réalisés au laboratoire ont permis de montrer que l'insertion de Bax au niveau de la membrane mitochondriale au cours de l'apoptose est facilitée par son

interaction avec des protéines du complexe TOM. Plus précisément, TOM 22 permet l'adressage de Bax à la mitochondrie et TOM40 permet son insertion dans la membrane (Bellot et al., 2007; Cartron et al., 2003, 2008). Cette interaction a lieu au niveau de l'hélice $\alpha 1$ de Bax et semble jouer un rôle fonctionnel puisque son inhibition diminue l'apoptose Bax dépendante.

1.5 Implication d'autres acteurs moléculaires

La régulation de la voie mitochondriale de l'apoptose est donc un mécanisme particulièrement complexe et fait l'objet de très nombreuses études depuis maintenant plus de trente ans. Ces études se sont concentrées en particulier sur le réseau d'interactions des protéines de la famille Bcl-2. Cependant il semble que l'étude des seules interactions protéine/protéine ne puisse pas permettre une compréhension totale des mécanismes apoptotiques. Au contraire, d'autres acteurs moléculaires tels que des ions (calcium) et différents lipides bioactifs (sphingolipides, acides gras, etc.) jouent un rôle prépondérant dans l'initiation et l'exécution de l'apoptose.

On sait aujourd'hui que la biosynthèse et le trafic intracellulaire des lipides sont étroitement liés avec l'apoptose. Les rôles des lipides au niveau de l'apoptose peuvent être envisagés à différents niveaux. Certains lipides membranaires sont par exemple capables d'entraîner une clusterisation des récepteurs de mort et ainsi de potentialiser leur action.

Des études récentes se sont intéressées à l'importance de la composition lipidique mitochondriale dans la survie ou la mort cellulaire (Crimi and Esposti, 2011; Horvath and Daum, 2013; Schug and Gottlieb, 2009). Une modification de la composition lipidique de la membrane mitochondriale peut influencer directement ses propriétés physiques et donc sa capacité à se perméabiliser. Enfin, certains lipides mitochondriaux (ou à proximité de la mitochondrie) sont directement impliqués dans la régulation de l'activité de protéines de la familles Bcl-2.

2 Lipides et apoptoses

Des lipides bioactifs sont donc considérés aujourd'hui comme des acteurs moléculaires importants de l'apoptose, impliqués notamment dans la régulation des protéines de la famille Bcl-2 (Figure 6).

Par exemple, la protéine tBid est capable de perméabiliser des liposomes en modifiant les propriétés biologiques de la membrane (déstabilisation de la bicouche lipidique et modification de la courbure de la membrane) (Epand et al., 2002). Mais l'efficacité de cette perméabilisation est largement dépendante de la composition lipidique de la membrane (Phosphatidylcholine, Phosphatidylethanolamine, Cardiolipine, Cholesterol) (Zhai et al., 2001).

De la même façon, certains lipides comme les acides gras sont capables d'induire l'insertion de Bax dans des liposomes et leur perméabilisation (Epand et al., 2004).

Les protéines tBid et Bax sont capables de perméabiliser des liposomes dont la composition est proche de celle de la mitochondrie. Par contre, si la composition des liposomes se rapproche de celle du RE tBid et Bax ne sont plus capables de les perméabiliser (Kuwana et al., 2002). Ce résultat confirme l'importance de la composition lipidique spécifique de la mitochondrie dans la perméabilisation de membranes par Bax.

D'autres lipides peuvent interagir avec Bax et réguler son activité. On distinguera alors deux types de situation concernant l'interaction Bax/lipide : les lipides récepteurs et les lipides ligands.

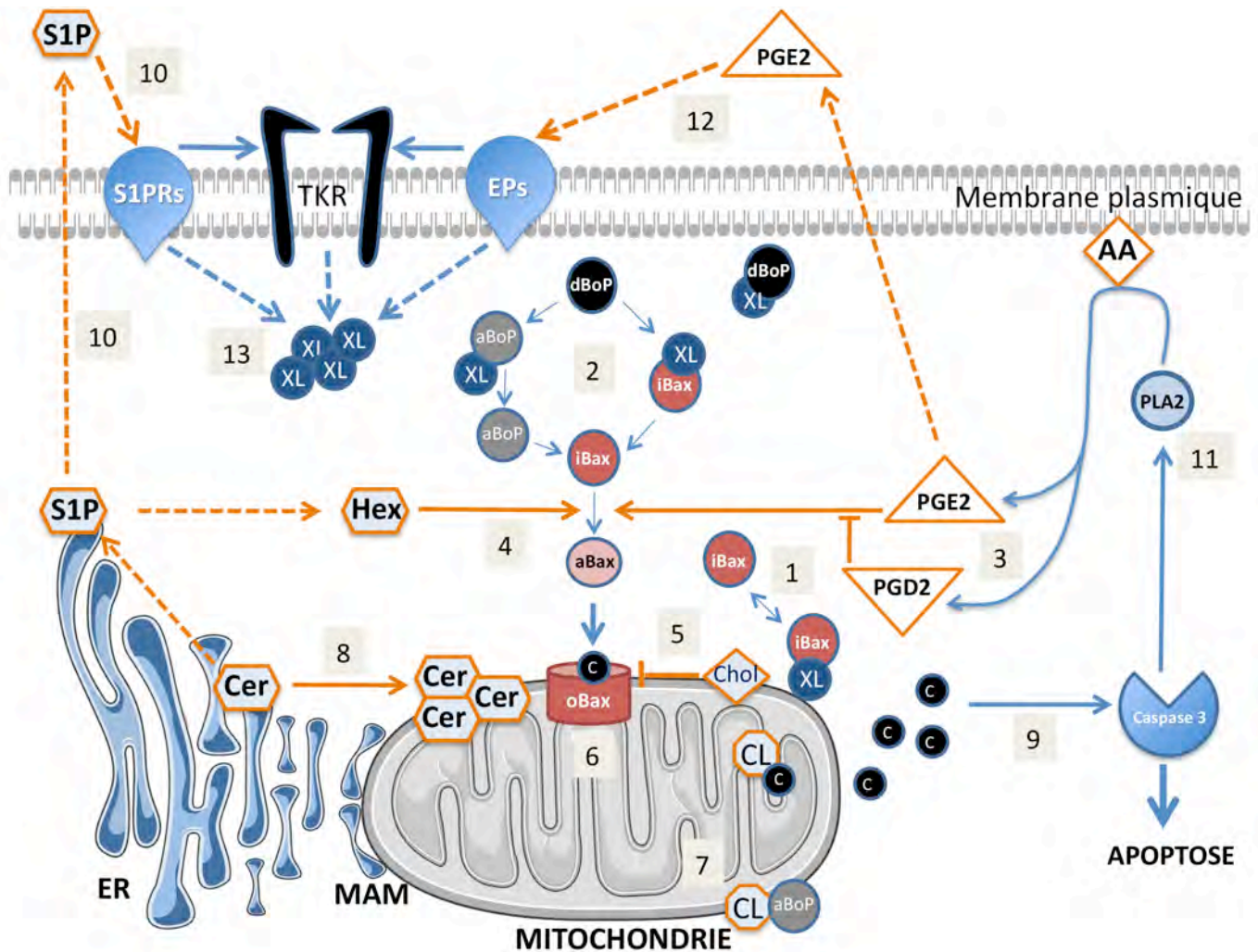


Figure 6 : Implication de lipides bioactifs dans l'activité pro-apoptotique de Bax.

Bax est présent dans le cytosol sous forme inactive (iBax) (1). En réponse à différents stress pro-apoptotiques, le réseau d'interactions entre les protéines de la famille Bcl-2 permet l'activation de Bax (2). PGE2 est capable d'induire l'activation de Bax alors que PGD2 inhibe cette activation (3). Des sphingolipides comme le céramide ou potentiellement l'héxadécénal, un de ses métabolites, peuvent induire l'activation de Bax (4). La forme active de Bax (aBax) s'insère dans la membrane mitochondriale externe, en partie grâce à son interaction avec le cholestérol. Mais un excès de cholestérol peut également inhiber l'oligomérisation de Bax (oBax) (5). Un autre lipide bioactif, le cardiolipin facilite l'insertion et l'oligomérisation de Bax (6) ainsi que l'insertion de protéines *BH3 only* activatrices (aBoP) comme tBid (7). Le céramide peut faciliter l'insertion de Bax dans la membrane mitochondriale *via* la formation de microdomaines enrichis en céramide (8) ou induire directement la MOMP *via* la formation de canaux céramide (8). L'oligomérisation de Bax et/ou la formation des canaux céramide induit la MOMP, le relargage de cytochrome c, l'activation des caspases et l'apoptose (9). La S1P, un autre lipide bioactif de la famille des sphingolipides, peut agir en tant que second messager au niveau intracellulaire ou être sécrétée. Au niveau extracellulaire, la S1P agit sur ses récepteurs membranaires (S1PRs) pour induire un signal de survie et de prolifération dans la majorité des cas (l'activité paracrine de la S1P dépend du type de récepteur exprimé à la surface des cellules) (10). L'activation des caspases augmente la synthèse des prostaglandines (11). Comme la S1P, PGE2 peut être sécrétée se fixer sur ses récepteur (EPs) et avoir une activité paracrine anti-apoptotique (12). L'activation des S1PRs, EPs induit une résistance à l'apoptose potentiellement *via* la surexpression de protéines anti-apoptotique de la famille Bcl-2 (13). D'après Mignard et al. 2014 « *Bioactive lipids and the control of Bax pro-apoptotic activity* » *Cell Death Dis.*

2.1 Lipides récepteurs

2.1.1 Cholesterol

Le cholestérol est un composant essentiel des membranes cellulaires. Il régule la fluidité membranaire, intervient dans la modulation des fonctions des protéines membranaires et participe à la régulation des processus de signalisation transmembranaire (Ikonen, 2008). Certaines cellules sont capables d'endocyter les LDL et HDL circulant mais le cholestérol peut également être synthétisé *de novo* au niveau du réticulum endoplasmique (Miller and Bose, 2011). La membrane mitochondriale externe est alimentée en cholestérol par trafic vésiculaire ou à l'aide de protéines de transport liées au cholestérol. Comparé à la membrane plasmique, le cholestérol est présent à un niveau relativement faible au niveau du réticulum endoplasmique et de la mitochondrie ce qui suggère un contrôle important de son transport intracellulaire (Mesmin and Maxfield, 2009). Il semble que le transport du cholestérol depuis le réticulum endoplasmique vers la membrane externe de la mitochondrie ait lieu au niveau de régions particulières du réticulum en contact avec la mitochondrie appelées les MAM (*Mitochondria Associated Membranes*) (Kornmann, 2013; Rowland and Voeltz, 2012). Le passage du cholestérol de la membrane externe vers la membrane interne de la mitochondrie nécessite l'intervention d'un complexe protéique comprenant la protéine TSPO (*Translocator Protein*) (Scarf and Kassiou, 2011).

2.1.1.1 Effet anti-apoptotique de l'accumulation de Cholestérol membranaire

Les données de la littérature concernant les modifications du transport du cholestérol au cours de l'apoptose ne sont pas très étendues. Cependant, quelques études suggèrent que des inhibiteurs de la synthèse de cholestérol sont capables d'activer la voie mitochondriale de l'apoptose (Cafforio et al., 2005; Herrero-Martin and López-Rivas, 2008; Jiang et al., 2004; Marcuzzi et al., 2013).

La lovastatin est un inhibiteur de l'HMG-CoA réductase qui bloque la synthèse de mévalonate et donc de cholestérol. Le traitement à la lovastatin sensibilise la lignée cellulaire HCT 116 (cancer du colon) aux stimuli pro-apoptotiques (5-FU ou Cisplatine) et induit une augmentation de l'expression de Bax et une diminution de l'expression de Bcl-2 (Agarwal et al., 1999). Dans une autre étude, la lovastatin réduit la survie de cellules de myélome (lignées cellulaires et primocultures de myélomes de patients) en

induisant l'apoptose sans modifier l'expression de Bax et Bcl-2 (van de Donk et al., 2002). Dans ce modèle de traitement à la lovastatin, l'inhibition de la synthèse de cholestérol induit l'apoptose ou sensibilise les cellules à d'autres stimuli pro-apoptotiques. Ces données laissent envisager un rôle anti-apoptotique du cholestérol. Ces premières observations sont confirmées dans des cellules HeLa traitées par le U18666A. Cette drogue induit une accumulation du cholestérol intracellulaire et mitochondrial sans modifier la morphologie mitochondriale ni l'expression de protéines impliquées dans l'apoptose (Smac/Diablo, cytochrome c, Bcl-xL, Bax, Bak). Cette accumulation de cholestérol entraîne l'inhibition de l'activation de Bax en empêchant sa liaison à la membrane (Lucken-Ardjomande et al., 2007).

2.1.1.2 Interaction Cholestérol-Bax

Les protéines capables d'interagir avec le cholestérol possèdent une séquence particulière conservée appelée CRAC (*Cholesterol Recognition Amino acid Consensus*). Cette séquence a été identifiée récemment au niveau de l'hélice $\alpha 5$ de Bax, une de ses hélices transmembranaires (Martínez-Abundis et al., 2011). De plus, l'addition de cholestérol sur des membranes mitochondriales entraîne une augmentation de la liaison de Bax à la membrane mais diminue sa capacité à s'intégrer dans ces membranes (Christenson et al., 2008).

Plusieurs études ont donc suggéré que le rôle du cholestérol dans l'apoptose dépend de sa concentration au niveau de la membrane mitochondriale. A de faibles concentrations, le cholestérol agit comme un récepteur de Bax pour faciliter son insertion dans les membranes (liposomes ou membrane mitochondriale externe) (Lucken-Ardjomande et al., 2007; Martínez-Abundis et al., 2009, 2011).

A de plus fortes concentrations, l'accumulation de cholestérol inhibe l'activation de Bax. Dans des liposomes, une concentration importante de cholestérol entraîne une diminution de la fluidité membranaire et une inhibition de l'oligomérisation de Bax induite par tBid (Lucken-Ardjomande et al., 2007). Une autre étude montre qu'une forte concentration en cholestérol bloque le passage de Bax d'une forme liée à la membrane vers une forme fonctionnelle intégrée à la membrane (Christenson et al., 2008). Dans des cellules de carcinomes hépatocellulaires l'accumulation de cholestérol induit une résistance partielle aux agents chimio-thérapeutiques en bloquant l'oligomérisation de

Bax (Montero et al., 2008). Il semble donc possible que les fortes concentrations de cholestérol mitochondrial retrouvées dans de nombreux types de tumeurs puissent être à l'origine d'un défaut d'oligomérisation de Bax et contribuent, au moins partiellement, à la résistance aux traitements (Corcos and Le Jossic-Corcos, 2013).

2.1.2 Cardiolipin

Le cardiolipin (ou diphosphatidylglycerol) est un phospholipide anionique. Il a d'abord été considéré comme un composant de la membrane mitochondriale interne uniquement. Pourtant le cardiolipin est également présent au niveau de la membrane externe, même si son taux exact reste controversé (23 % des cardiolipins mitochondriaux sont présents au niveau de la membrane externe (Hovius et al., 1990), ce qui représente 0,3 à 3 % des lipides mitochondriaux totaux (de Kroon et al., 1997)).

2.1.2.1 Oxydation du cardiolipin et relargage du cytochrome c

Le cardiolipin joue un rôle essentiel dans la voie mitochondriale de l'apoptose. En effet, l'oxydation des cardiolipins de la membrane mitochondriale interne est nécessaire au relargage du cytochrome c (Nomura et al., 2000). De façon plus précise, au niveau de l'espace intermembranaire de la mitochondrie le cytochrome c est lié aux cardiolipins de la membrane mitochondriale interne. Au cours de l'apoptose et pour permettre le relargage du cytochrome c, les cardiolipins sont oxydés ce qui entraîne la séparation du complexe cardiolipin-cytochrome c. Le pool de cytochrome c soluble ainsi formé pourra ensuite être libéré dans le cytosol suite à la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale induite par Bax par exemple (Ott et al., 2002). L'insertion de Bax dans la membrane mitochondriale externe est d'ailleurs suffisante pour induire la production d'ions superoxydes et l'oxydation des cardiolipins (Jiang et al., 2008).

2.1.2.2 Interaction Cardiolipin-protéines de la famille Bcl-2

Une autre propriété des cardiolipins les lie fortement à la voie mitochondriale de l'apoptose : leur capacité à interagir avec des protéines de la famille Bcl-2. Ils permettent par exemple l'adressage de tBid à la mitochondrie. Dans des cellules déficientes en

cardiolipin l'adressage de tBid à la mitochondrie est fortement diminué (Lutter et al., 2000). Les cardiolipins sont également capables d'interagir avec Bax. Il a été montré dans des liposomes que les cardiolipins sont nécessaires à la fixation de l'hélice $\alpha 1$ de Bax à la membrane, puis à son insertion et à son oligomérisation (Sani et al., 2009). Il semble cependant qu'en l'absence de cardiolipin, certaines protéines (non identifiées) de la membrane mitochondriale externe puissent aider à l'insertion de Bax à la membrane (Schafer et al., 2009).

2.1.3 Environnement lipidique et induction de l'apoptose

En résumé, cholestérol et cardiolipin sont deux régulateurs importants des mécanismes apoptotiques. Ils peuvent agir de façon directe *via* leurs interactions avec Bid ou Bax pour faciliter leur insertion à la membrane. Mais leur action peut également être plus indirecte et résulter de leur capacité à modifier les propriétés physiques de la membrane mitochondriale. Ces deux effets pouvant même être opposés. On peut ici parler d'environnement lipidique favorable ou non à l'induction de l'apoptose. Des modifications de cet environnement lipidique pourront, selon leur nature, aussi bien favoriser l'entrée en apoptose ou être à l'origine d'un défaut d'induction de l'apoptose.

2.2 Lipides ligands

2.2.1 Prostaglandines

Les prostaglandines sont des lipides bioactifs sécrétés, impliqués dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques dont : la réponse inflammatoire, l'homéostasie cardiovasculaire, les fonctions reproductrices et la carcinogénèse. Les cyclooxygénases (Cox-1 et Cox-2) catalysent la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandine H₂ (PGH₂). PGH₂ peut ensuite être transformée en d'autres prostaglandines comme PGE₂ et PGD₂ par exemple, synthétisées respectivement par les prostaglandines synthases PGES et PGDS (Cha et al., 2006).

Le rôle des prostaglandines dans la réponse inflammatoire est évoqué pour la première fois au début des années 1970, principalement avec la découverte du rôle des anti-inflammatoires non stéroïdiens dans l'inhibition des cyclooxygénases (Kaley and Weiner, 1971; Vane, 1971). On sait aujourd'hui que les prostaglandines jouent effectivement un rôle majeur dans l'apparition de la réponse inflammatoire (Cha et al., 2006; Portranova et al., 1996).

2.2.1.1 Prostaglandines et Cancer

Etant donné les liens parfaitement établis entre les inflammations chroniques et l'augmentation significative du risque de cancer, les prostaglandines ont également été étudiées pour leur effet pro-tumoral (Wang and DuBois, 2006). Il a d'ailleurs été montré que PGE₂ est capable d'augmenter la croissance tumorale en se liant à des récepteurs membranaires couplés aux protéines G (EP receptor) et en induisant ainsi l'activation de différentes voies cellulaires associées à la prolifération, la migration et la survie cellulaire ainsi qu'à l'angiogénèse (Rundhaug et al., 2011). Ces différentes observations ont poussé au développement de différents inhibiteurs de Cox-2 pour leur activité anti-tumorale (Wang and DuBois, 2006).

2.2.1.2 Rôle pro-apoptotique du PGE2 intracellulaire (interaction avec Bax)

Comme il a déjà été dit, les prostaglandines sont des lipides sécrétés et les effets pro-inflammatoires et pro-tumoraux décrits ci-dessus sont tous associés à leur liaison sur les récepteurs EP. Des études récentes viennent cependant nuancer ce point de vue en s'intéressant aux effets intracellulaires des prostaglandines sur la régulation de l'apoptose Bax-dépendante.

Une première étude menée au laboratoire s'est basée sur l'identification de deux groupes de patients atteints de glioblastomes multiformes et présentant des niveaux d'expression différents de PGES microsomal (mPGES). Cette étude montre de façon inattendue une corrélation entre une forte expression de mPGES et une augmentation de la survie des patients (Lalier et al., 2007b). D'un point de vue fonctionnel, l'expression élevée de mPGES est associée à une augmentation de l'apoptose spontanée ou induite par la staurosporine. L'inhibition de l'expression de mPGES par siRNA entraîne une forte résistance à l'apoptose. L'action de mPGES dans ce mécanisme passe par une augmentation de la synthèse de PGE2 puisque des micro-injections intracellulaires de PGE2 entraînent une augmentation de l'apoptose Bax-dépendante (Lalier et al., 2007b). Cette étude a mis en évidence pour la première fois un effet pro-apoptotique de PGE2 au niveau intracellulaire, s'opposant à son activité paracrine d'induction de l'inflammation et de la survie. La suite de ce travail montre d'ailleurs que cet effet pro-apoptotique de PGE2 n'est pas dépendant du type cellulaire. En effet, l'augmentation de PGE2 au niveau intracellulaire, par microinjections ou par inhibition pharmacologique de son export, augmente l'apoptose Bax dépendante dans des lignées cellulaires de cancer du colon (Lalier et al., 2011a). D'un point de vue moléculaire, PGE2 interagit directement avec Bax, induit son changement conformationnel et son insertion à la membrane mitochondriale externe (Lalier et al., 2007b). Des expériences de *peptide scan* et de mutagenèses dirigées ont permis de montrer que PGE2 se lie à la cystéine 126 présente entre les deux hélices transmembranaires $\alpha 5$ et $\alpha 6$ de Bax et que cette cystéine est nécessaire à l'activation de Bax par PGE2 (Lalier et al., 2011b). Il semble important de noter ici que les modes d'activation de Bax par PGE2 et tBid sont différents. En effet, PGE2 et tBid n'interviennent pas sur les mêmes régions de Bax mais peuvent coopérer pour induire l'apoptose (Lalier et al., 2011b).

2.2.1.3 Rôle intracellulaire d'autres prostaglandines

La prostaglandine D2 (PGD2) est capable de bloquer l'interaction entre Bax et PGE2 et donc d'inhiber l'apoptose induite par PGE2.

La prostaglandine A2 (PGA2) est issue de la dégradation non enzymatique de PGE2. PGA2 est également capable d'induire l'activation de Bax, sa translocation à la mitochondrie et l'apoptose, dans un modèle de glioblastome multiforme (Lalier et al., 2011b). Ces données sont confirmées par d'autres études montrant que PGA2 inhibe la croissance cellulaire et induit l'apoptose dans la lignée cellulaire HL-60 (leucémie promyélocytaire) sans pour autant établir dans ce cas un lien direct avec Bax (Kim et al., 2002; Lee et al., 2010).

2.2.1.4 Effet des prostaglandines sur la conformation de Bax

Des travaux réalisés au laboratoire montrent que les prostaglandines ont un effet direct sur la conformation de Bax. Au cours de ces expériences, la conformation de Bax est analysée par spectrométrie de fluorescence, une technique permettant d'étudier les changements de conformation des protéines ou les interactions entre les protéines. Cette technique repose sur la mesure de la fluorescence émise par les résidus tryptophanes. Cette fluorescence est très variable en fonction de la polarité de l'environnement et fournit donc une indication sur le degré d'exposition des résidus tryptophanes au solvant (Callis and Burgess, 1997; Lakowicz, 2007).

On compte six résidus tryptophanes dans la séquence de Bax. Les deux premiers sont situés en positions 47 et 51. Les suivants sont situés dans la région 100-130, en positions 100, 117, 121 et 127, c'est à dire très proche de la zone d'interaction entre Bax et les prostaglandines.

Dans sa conformation de base (non activée, à pH neutre) Bax émet une fluorescence maximale à 339,5 nm. L'activation de Bax à pH4 entraîne un décalage cette émission à 338,5 nm (cette modification peut ici être considérée comme une signature de l'activation de Bax). L'ajout de PGE2 entraîne un décalage comparable de l'émission maximale de Bax. Par contre, l'ajout de PGD2 induit un décalage différent (339,5-343,5 nm) (Figure 7).

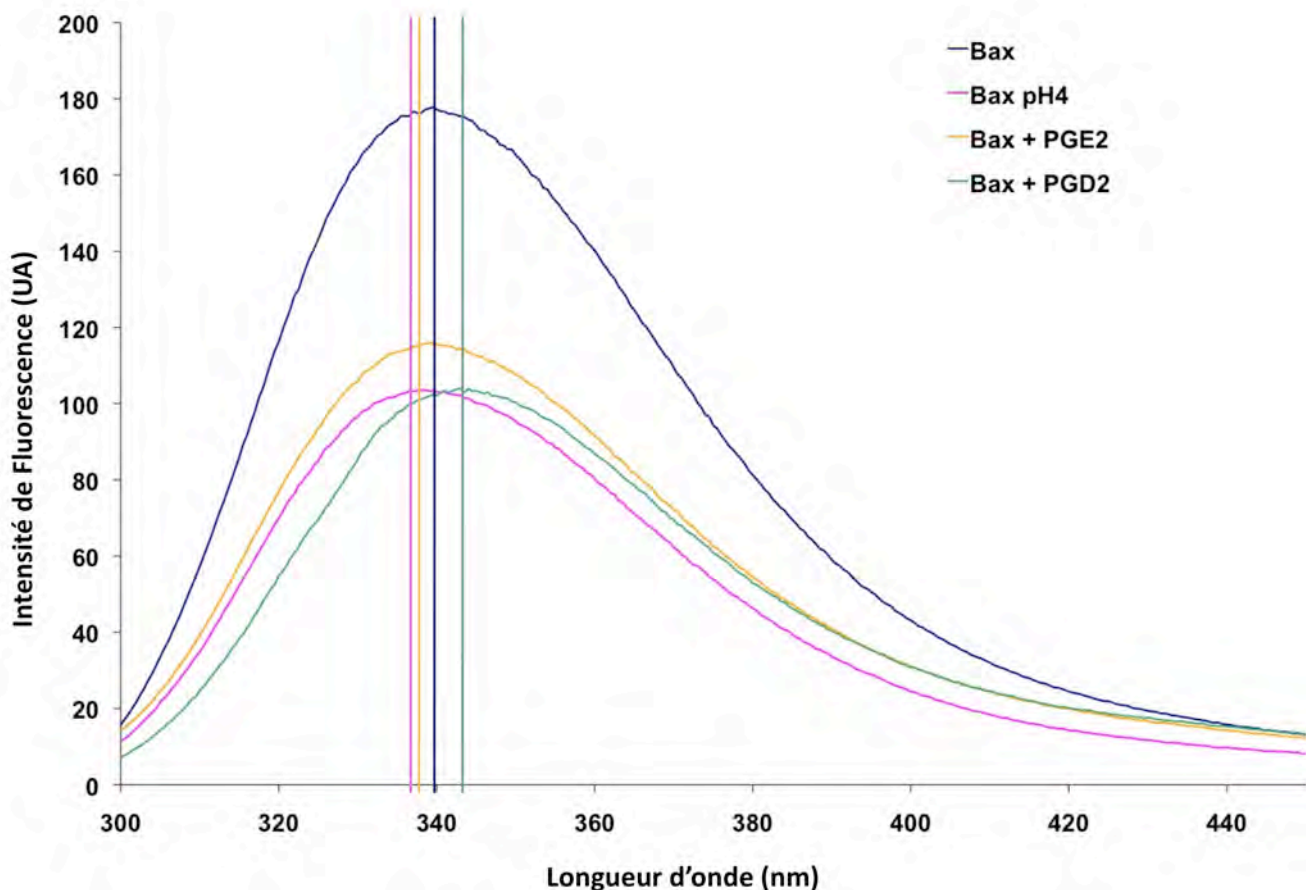


Figure 7 : Effet de PGE2 sur la conformation de Bax (spectroscopie de fluorescence).

L'effet des prostaglandines sur la conformation de Bax est analysé en observant les modifications de l'émission de fluorescence des tryptophanes lors de l'incubation de Bax purifié en présence de PGE2 ou PGD2. La fluorescence maximale de Bax seul à pH7 se situe à 339 nm. L'activation de Bax à pH4 induit une diminution de l'intensité de fluorescence d'environ 50 % et un décalage de l'émission maximale de 339 à 338,5 nm. L'incubation de Bax avec PGE2 entraîne des modifications similaires sur l'intensité de fluorescence et sur le décalage de l'émission maximale. On peut supposer que l'activation de Bax à pH4 ou son incubation avec PGE2 induit un changement conformationnel de Bax entraînant une diminution de l'exposition d'un ou plusieurs résidus tryptophanes. Par contre, l'incubation de Bax avec PGD2 entraîne une diminution de l'intensité de fluorescence mais un décalage inverse du pic de fluorescence maximale de 339 à 343 nm. On peut supposer ici que PGD2 entraîne un changement conformationnel de Bax augmentant l'exposition d'un ou plusieurs résidus tryptophanes. Ces résultats suggèrent que PGE2 et PGD2 induisent des changements conformationnels de Bax différents, voire opposés, ce qui est cohérent avec les effets biologiques observés. D'après Mignard et al. 2014 « *Bioactive lipids and the control of Bax pro-apoptotic activity* » *Cell Death Dis.*

2.2.1.5 Régénération tissulaire et Repopulation tumorale

En résumé, la présence de PGE2 au niveau extracellulaire entraîne une augmentation de la prolifération cellulaire *via* sa liaison aux récepteurs EP (Rundhaug et al., 2011). A l'opposé, une augmentation du PGE2 intracellulaire induit l'activation de Bax et donc de la voie mitochondriale de l'apoptose (Lalier et al., 2007b, 2011a, 2011b).

Un modèle a été proposé pour concilier ces deux effets qui peuvent paraître contradictoires. L'induction de l'apoptose entraîne une augmentation du niveau de PGE2 intracellulaire, qui participe alors de façon active aux mécanismes apoptotiques. PGE2 est ensuite sécrété dans le milieu extracellulaire (ou libéré après lyse de la cellule) où il joue cette fois un rôle de signal de danger, induisant la prolifération cellulaire.

Ce modèle est applicable à la régénération tissulaire après une blessure (Li et al., 2010) ou à la repopulation tumorale après un traitement (Huang et al., 2011). En ce qui concerne la régénération tissulaire, il a été montré que l'augmentation du niveau de PGE2 au cours de l'apoptose est due à l'activation de la phospholipase A2 (iPLA2) par les caspases 3 et 7, qui entraîne la production d'acide arachidonique et donc de PGE2. De plus, ce mécanisme entraîne la prolifération des cellules souches et des progéniteurs présents dans les tissus (Li et al., 2010).

2.3 Sphingolipides

Les sphingolipides sont une famille de lipides membranaires, composés d'une base sphingoïde, d'un acide gras et d'un groupe supplémentaire (hydrogène, ose, phosphocholine) sur la fonction alcool primaire de la sphingosine. Ce sont des composants essentiels de la membrane plasmique et des membranes des organelles des cellules eucaryotes.

Les sphingolipides sont également des molécules effectrices jouant un rôle important dans différentes voies de signalisations, telles que la réponse inflammatoire, l'apoptose, la sénescence, la prolifération et la migration cellulaire (Hannun and Obeid, 2008). Les sphingolipides tiennent donc également une place importante dans les mécanismes d'initiation et de progression tumorale ainsi que dans la réponse aux traitements (Ogretmen and Hannun, 2004).

L'acteur principal du métabolisme des sphingolipides et le plus étudié est le céramide (Figure 8). Les céramides sont composés d'une base sphingoïde et d'un acide gras de tailles variables (14 à 24 carbones) dont la longueur peut d'ailleurs influencer les propriétés biologiques des céramides (Grösch et al., 2012). De nombreux stimuli pro-apoptotiques (TNF- α , interféron- γ , Fas, rayonnements ionisants, agents chimiothérapeutiques, etc.) induisent une augmentation du niveau de céramide *via* la synthèse *de novo* ou par hydrolyse de la sphigomyéline (Hannun, 1996; Ogretmen and Hannun, 2004). Le céramide ainsi généré peut être considéré comme un lipide bioactif à l'origine de l'induction de l'apoptose et de l'arrêt du cycle cellulaire (Taha et al., 2006a).

2.3.1 Synthèse *de novo* du céramide

La synthèse *de novo* du céramide (Figure 8) a lieu au niveau du réticulum endoplasmique. Cette voie de synthèse commence par la condensation d'une sérine et d'un palmitoyl-CoA, par une sérine palmitoyl transférase, pour former la 3-Ketosphinganine. Celle-ci est réduite en sphinganine (ou dihydrosphingosine). La sphinganine est alors transformée en dihydrocéramide par une des 6 céramides synthases (CerS1-CerS6) (Mullen et al., 2012). Une désaturase introduit une double liaison en position trans-4,5 pour former le céramide (Reynolds et al., 2004). Les céramides synthases permettent également de produire du céramide à partir de sphingosine, on peut alors parler de recyclage de la sphingosine (*salvage pathway*)

(Figure 8) (Mullen et al., 2012).

Il a été montré que la voie de synthèse *de novo* du céramide est impliquée dans l'apoptose induite par différents stress cellulaires (daunorubicine, étoposide, FAS ou encore les rayonnements ionisants) (Bose et al., 1995; Chalfant et al., 2001; Liao et al., 1999; Perry et al., 2000). La génération de céramide par la voie de synthèse *de novo* n'est détectable que plusieurs heures après le stress cellulaire (2 à 3 heures) mais entraîne une augmentation importante et prolongée du taux de céramide.

2.3.2 Hydrolyse de la sphingomyéline

La génération de céramide par hydrolyse de la sphingomyéline est catalysée par les sphingomyélinases (SMases) (Figure 8). Il existe plusieurs isoformes de SMases caractérisées par des différences de pH optimal (acide, neutre ou alcalin). Les sphingomyélinases acide (aSMase) et neutre (nSMase) sont activées très rapidement et de façon transitoire par différents stimuli. Leur activation entraîne une génération très rapide de céramide (en quelques secondes ou minutes) (Mathias et al., 1998).

En réponse à des stimuli pro-apoptotiques (Fas, rayonnements ionisants) l'aSMase est transloquée au niveau de la face externe de la membrane plasmique où elle hydrolyse la sphingomyéline en céramide (Haimovitz-Friedman et al., 1994; Kirschnek et al., 2000).

2.3.3 Métabolisme du céramide

Une fois synthétisé, le céramide peut s'accumuler ou bien être métabolisé en différentes autres espèces de sphingolipides (Figure 8). Le céramide peut subir une phosphorylation par la céramide kinase pour former du céramide-1-phosphate. Sa déacylation par une céramidase produit de la sphingosine qui pourra elle-même être phosphorylée pour former de la sphingosine-1-phosphate (S1P) (Reynolds et al., 2004). La sphingomyéline synthase catalyse la réaction inverse des SMases en formant de la sphingomyéline à partir de céramide.

Le céramide peut également être glycosylé par la glucosylcéramide synthase au niveau de l'appareil de Golgi pour former du glucosylcéramide puis d'autres formes glycosylées plus complexes (lactosylcéramide par exemple).

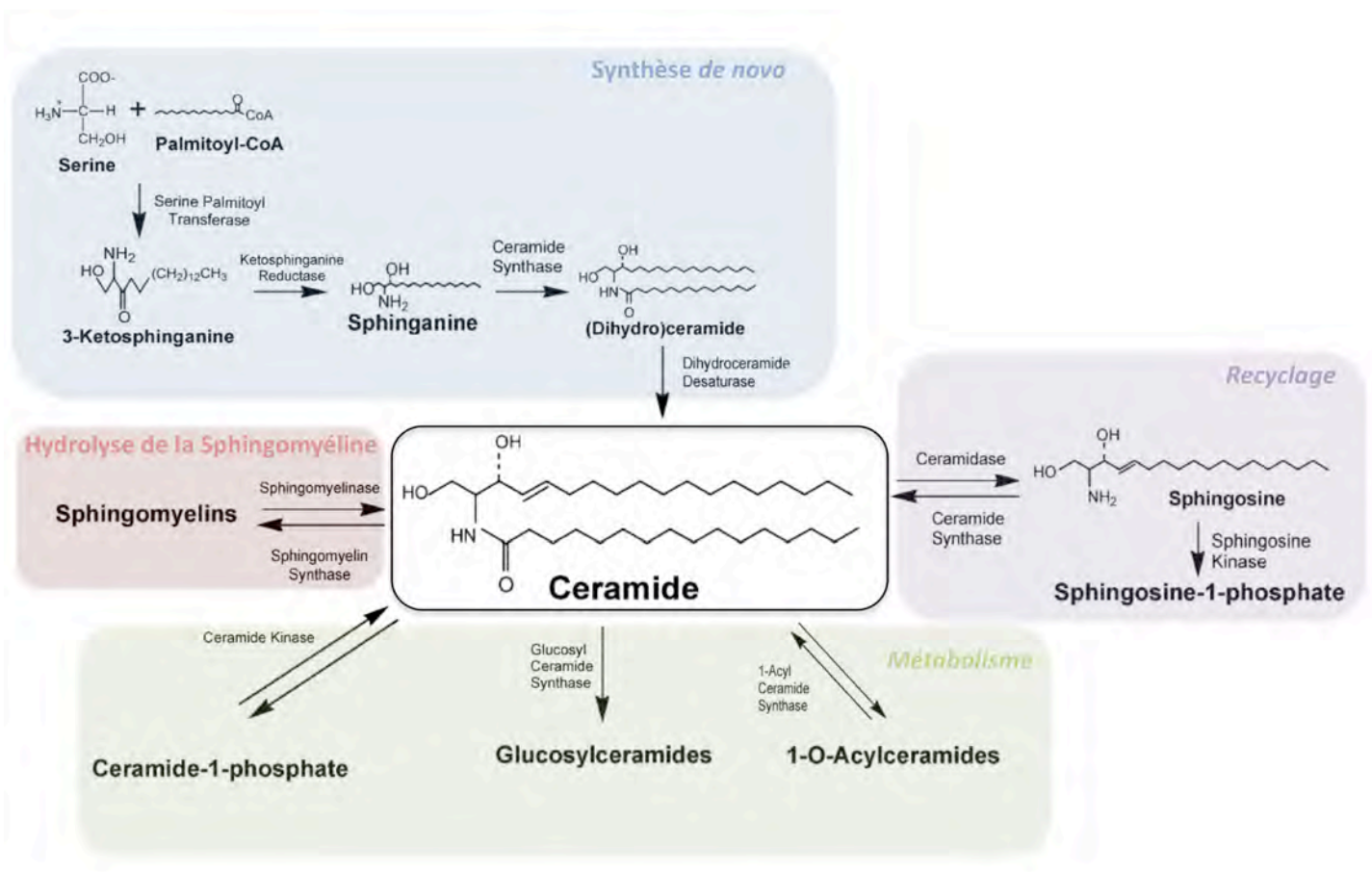


Figure 8 : Schéma des principales voies de synthèse et de métabolisme du céramide.

Le céramide peut être généré par la voie de synthèse *de novo* à partir de la condensation d'une sérine et d'un Palmitoyl-CoA. Cette voie de synthèse nécessite l'action combinée d'une serine palmitoyl transférase et des céramides synthases. Le céramide peut également être généré par hydrolyse de la sphingomyéline ou par recyclage de la sphingosine. Le céramide peut ensuite être métabolisé en d'autres espèces de sphingolipides après avoir subi différentes modifications (glycosylation, acylation, phosphorylation). La sphingosine-1-phosphate (S1P) est un autre sphingolipide biologiquement actif qui est généré suite à la phosphorylation de la sphingosine sous l'action de la sphingosine kinase (SK). D'après Reynolds et al. 2004 « *Ceramide synthesis and metabolism as a target for cancer therapy* » *Cancer Lett.*

2.3.4 Interactions entre le céramide et les protéines de la famille Bcl-2

Etant donné le rôle pro-apoptotique du céramide, de nombreuses études se sont intéressées aux interactions entre le céramide et les protéines de la familles Bcl-2.

En ce qui concerne les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, il a été montré que la surexpression de Bcl-2 inhibe l'apoptose induite par le céramide exogène dans la lignée cellulaire ALL-697 (leucémie aiguë lymphoblastique) (Zhang et al., 1996). Dans un modèle de carcinome mammaire (MCF-7), la surexpression de Bcl-xL inhibe la génération de céramide et l'apoptose induite par le TNF- α alors que la surexpression de Bcl-2 inhibe uniquement l'apoptose induit épar le TNF- α mais pas la génération de céramide (El-Assaad et al., 1998). Selon les auteurs, ces résultats suggèrent qu'il n'y a pas de redondance dans le rôle anti-apoptotique de Bcl-2 et Bcl-xL. Dans ce modèle

d'apoptose céramide-dépendante induite par le TNF- α , Bcl-xL se situe en amont de la génération et de l'accumulation de céramide et Bcl-2 en aval.

Le céramide est également capable d'interagir avec les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2. Il a été montré que l'irradiation de souris entraîne l'apoptose des cellules endothéliales au niveau des cryptes intestinales *via* la génération de céramide par hydrolyse de la sphingomyéline. L'inactivation de l'expression de l'aSMase inhibe l'induction de l'apoptose (Paris et al., 2001). Dans le même modèle, les invalidations de l'expression de Bax ou de Bak entraînent l'inhibition de l'apoptose radio-induite, mimant les effets de l'inactivation de l'aSMase (Rotolo et al., 2008). Comme pour Bcl-2 et Bcl-xL, ces données semblent montrer que les rôles de Bax et Bak ne sont pas strictement redondant lors de l'induction céramide dépendante de l'apoptose.

Une étude a également montré que lors de l'apoptose induite par les UV-C, Bak et dans une moindre mesure Bax sont nécessaires à la génération des céramides à longues chaînes *via* l'activation des céramides synthases (Siskind et al., 2010).

2.3.5 Modèles d'induction de l'apoptose dépendante du couple céramide/Bax

De nombreuses études montrent que la génération de céramide est nécessaire à l'activation de Bax et à l'induction de l'apoptose, dans plusieurs types cellulaires et en réponse à différents stimuli pro-apoptotiques (céramide exogène, TNF- α , UV, Hypoxie/Ré-oxygénation, rayonnements ionisants).

- Dans les lignées DU 145 (carcinome de la prostate) et HCT116 le céramide exogène n'induit pas l'apoptose dans les cellules Bax déficientes (DU 145 wt et HCT116 Bax ko). La ré-expression de Bax rétablit la sensibilité des cellules à l'apoptose induite par le céramide (von Haefen et al., 2002).

- Dans la lignée MCF-7, le TNF- α induit une accumulation de céramide au niveau des mitochondries suivie de l'activation de Bax et de sa translocation à la mitochondrie. L'ajout de SMase bactérienne (bSMase) ciblant spécifiquement la mitochondrie est suffisant pour générer du céramide et augmenter la translocation de Bax à la mitochondrie (Birbes et al., 2005).

- Lors de l'exposition aux UV de cellules Hela, la génération de céramide *via* l'hydrolyse de la sphingomyéline est nécessaire et suffisante à l'activation de Bax et à l'induction de l'apoptose (Kashkar et al., 2005).

- Dans des cellules NT-2 (précurseurs neuronaux) le traitement par hypoxie/ré-oxygénation entraîne la génération de céramide, *via* l'hydrolyse de la sphingomyéline et la voie de recyclage de la sphingosine. Le céramide ainsi généré induit l'activation de Bax et l'apoptose (Jin et al., 2008)

Ces études montrent que la génération de céramide provoque l'activation de Bax et que cette dernière est nécessaire à l'induction de l'apoptose. Bien que ces travaux décrivent une simple suite d'évènements interdépendants, une autre étude propose un mécanisme plus précis. Celle-ci montre que l'irradiation de cellules Hela à 10 Gy entraîne la génération de céramide et la formation de microdomaines enrichies en céramide au niveau de la membrane mitochondriale. Bax s'insère alors préférentiellement dans ces microdomaines pour induire la perméabilisation de la membrane mitochondriale (Lee et al., 2011).

2.3.6 Canaux céramide

Un autre rôle du céramide au niveau de la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe a été proposé : la formation de canaux céramide. Les céramides de différentes longueurs de chaînes (C2 à C16) sont en effet capables, à des concentrations physiologiques, de former des pores sur des membranes phospholipidiques. La formation de ces pores entraîne alors une augmentation de la conductance et donc de la perméabilité des membranes (Siskind and Colombini, 2000). La structure proposée pour ces canaux céramide est un anneau formé de colonnes organisées de façon antiparallèle et elles-mêmes composées de 6 molécules de céramide reliées par des liaisons hydrogènes (Siskind et al., 2003).

Sur des mitochondries isolées, le céramide induit, potentiellement *via* la formation de ces pores, une augmentation de la perméabilité de la membrane mitochondriale externe. Cette perméabilisation est réversible en diminuant la concentration en céramide dans le milieu (Siskind et al., 2002). De plus, le niveau de la perméabilité de la membrane mitochondriale externe est directement corrélé avec le niveau de céramide dans la membrane. Enfin cet effet du céramide est spécifique à la membrane mitochondriale puisque le céramide n'entraîne pas la perméabilisation d'érythrocytes, même à des concentrations 20 fois supérieures (Siskind et al., 2006).

D'autres sphingolipides peuvent interférer avec la formation des canaux céramide. Le dihydrocéramide et la sphingosine sont capables d'inhiber la formation de ces canaux sur des mitochondries isolées (Elrick et al., 2006; Stiban et al., 2006). Les protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et CED-9 (son homologue chez *C. Elegans*) inhibent également la formation de ces canaux, toujours sur mitochondries isolées. Par contre les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak ne semblent pas indispensables à la formation de ces canaux (Siskind et al., 2008).

2.3.7 Sphingosine-1-phosphate

Un autre acteur particulièrement important du métabolisme des sphingolipides est la sphingosine-1-phosphate (S1P). La S1P joue un rôle antagoniste à celui du céramide puisqu'elle induit une augmentation de la prolifération et de la survie cellulaire et inhibe l'apoptose (Taha et al., 2006a). De nombreuses études abordent ainsi la notion d'équilibre entre les taux de céramide et de S1P, déterminant pour la réponse cellulaire à de nombreux stimuli pro-apoptotiques.

La formation de la S1P est dépendante de l'activité de la sphingosine kinase (SK). L'activation de la SK entraîne également la diminution des taux de céramide et de sphingosine (Kohama et al., 1998). La surexpression de la SK (dans des fibroblastes et des cellules HEK293) entraîne une augmentation du taux de S1P, induit la prolifération cellulaire et accélère la transition G1/S et la synthèse d'ADN (Olivera et al., 1999).

A l'opposé, l'extinction de l'expression de SK par siRNA dans la lignée MCF-7 entraîne l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose ainsi que l'accumulation de céramide dans les cellules (et dans les fractions enrichies en mitochondries). Cette accumulation de céramide semble alors être directement à l'origine de l'activation de Bax et de la voie mitochondriale de l'apoptose puisque l'inhibition pharmacologique de la synthèse *de novo* du céramide (traitement à la myriocin) bloque les effets de l'extinction de la SK (Taha et al., 2006b).

L'activation de la SK et la génération de S1P sont impliquées dans l'activité pro-proliférative de différents facteurs de croissance comme le PDGF (*platelet-derived growth factor*) et le SVF (sérum de veau fœtal) (Olivera and Spiegel, 1993) ou encore le NGF (*nerve growth factor*) (Edsall et al., 1997).

La S1P est également capable de protéger de nombreux types cellulaires de l'apoptose induite par différents stimuli pro-apoptotiques comme Fas, le TNF- α , du céramide exogène ou encore la SMase (Cuvillier and Levade, 2001; Cuvillier et al., 1996, 1998; Kleuser et al., 1998; Xia et al., 1999).

2.3.8 Sphingolipides et communication RE - Mitochondrie

En 2012, une étude confirme l'importance des sphingolipides dans la perméabilisation des mitochondries et donc dans le déroulement de la voie mitochondriale de l'apoptose. Les auteurs de cette étude ont montré à l'aide de mitochondries purifiées (séparées de fragments de réticulum endoplasmique (RE) normalement présents à leur surface) que les sphingolipides présents dans le RE sont nécessaires à la perméabilisation de la membrane mitochondriale par Bax ou Bak. Étonnamment, ils montrent que l'effet du céramide sur l'activation des effecteurs Bax/Bak et sur la MOMP n'est pas direct mais passe par la synthèse d'autres métabolites. De façon plus précise, la S1P et l'héxadécénal sont nécessaires à la MOMP induite respectivement par Bak et Bax pré-activés par tBid (Chipuk et al., 2012).

Ces données soulèvent plusieurs questions importantes. Tout d'abord, la remise en cause du rôle anti-apoptotique de la S1P, pourtant largement admis. Pour expliquer ces observations paradoxales il est possible d'envisager deux rôles différents de la S1P en fonction de sa localisation ou encore des différents types cellulaires considérés. Par exemple, la S1P intracellulaire serait capable d'induire ou de faciliter l'activation de Bak, tandis que la S1P extracellulaire induirait des signaux de survie et de prolifération *via* la fixation à ses récepteurs, hypothèse très proche de celle décrite précédemment pour PGE2 (Figure 5) (Young and Van Brocklyn, 2006). De plus, la liaison de la S1P sur certains de ses récepteurs peut induire la prolifération cellulaire (S1P1, S1P3 et S1P5) alors que sa liaison sur d'autres récepteurs aura un effet anti-prolifératif (S1P2) (Tabasinezhad et al., 2013; Young and Van Brocklyn, 2006). L'effet de la S1P dépend du type de récepteurs exprimé par la cellule. Cela pourrait éventuellement expliquer l'effet anti-prolifératif de la S1P sur certains types cellulaires comme les hépatocytes (Ikeda et al., 2003), les lymphocytes T (Dorsam et al., 2003; Jin et al., 2003), les kératinocytes (Kim et al., 2004) et les cellules de cancer gastrique (Yamashita et al., 2006).

Ensuite, l'étude remet en cause le rôle pro-apoptotique direct du céramide. Cette observation pourrait être expliquée en plaçant le céramide dans le rôle de précurseur d'autres sphingolipides, la S1P et l'héxadécénal devenant alors les molécules bioactives. On peut cependant nuancer cette hypothèse étant donné la quantité très importante de données bibliographiques qui montrent que le céramide joue un rôle direct dans l'induction de l'apoptose, même si son mécanisme d'action n'est pas toujours bien défini.

Enfin, la question principale soulevée par cette étude est celle de la localisation subcellulaire des sphingolipides. Comme il a été dit précédemment, le céramide peut être généré au niveau de la membrane plasmique (hydrolyse de la sphingomyéline), du RE (synthèse *de novo*), ou encore subir des modifications au niveau de l'appareil de Golgi (glycosylations) pour que finalement le céramide ou d'autres métabolites participent à la perméabilisation de la membrane mitochondriale. Il semble intéressant de comprendre comment des molécules particulièrement hydrophobes comme les sphingolipides sont redistribuées de façon très dynamique dans les différents compartiments subcellulaires, sièges de leur synthèse, de leur métabolisme ou de leurs rôles fonctionnels.

Différents mécanismes responsables du trafic lipidique au sein des cellules sont connus. Le trafic vésiculaire est important entre le RE et l'appareil de golgi mais il n'est pas décrit entre le RE et la mitochondrie.

Les protéines de transfert lipidique sont peu décrites en ce qui concerne le céramide, à part CERT et FAPP2 qui transportent le céramide du RE à l'appareil de golgi, mais encore une fois il n'y a pas de transport connu vers la mitochondrie.

Enfin, une dernière solution repose sur la présence de points de contacts physiques entre les organelles. Ces contacts sont largement connus entre le RE et la mitochondrie, il s'agit des MAM.

3 Contacts ER-Mitochondries : les MAM

3.1 Généralités

Les contacts entre le RE et les mitochondries sont observés depuis plus de 50 ans par microscopie électronique. Ces observations ont pu être effectuées sur des coupes de tissus mais également sur des mitochondries isolées (Copeland and Dalton, 1959; Montisano et al., 1982; Pickett et al., 1980). Plus récemment, les progrès techniques en imagerie et la reconstitution en 3 dimensions de microscopie électronique ont permis une observation directe et à très haute résolution de ces contacts (Figure 9) (Friedman et al., 2011). On peut voir sur ces images le RE s'enrouler autour des mitochondries à différents degrés, le contact s'effectuant alors sur une fraction ou sur la totalité de la circonférence mitochondriale.

Les premiers protocoles d'isolement des MAM ont été mis au point au début des années 1990. Les mitochondries isolées par des protocoles classiques de centrifugation différentielle contiennent des marqueurs du RE. Une étape supplémentaire de purification de ces mitochondries, par ultracentrifugation sur une solution de percoll, permet de séparer des mitochondries « pures » (ne contenant plus de marqueurs de RE) et une fraction particulière du RE qui était liée à ces mitochondries : les MAM (Vance, 1990).

Les MAM sont aujourd'hui le sujet de très nombreuses études qui ont montré leur implication dans différents processus cellulaires (synthèse de lipides, homéostasie calcique, dynamique mitochondriale, etc.). De plus, des dysfonctionnements dans la communication entre le RE et les mitochondries pourraient être impliqués dans des pathologies humaines telles que les maladies neurodégénératives, les infections virales ou encore le diabète et l'obésité (Vance, 2014).

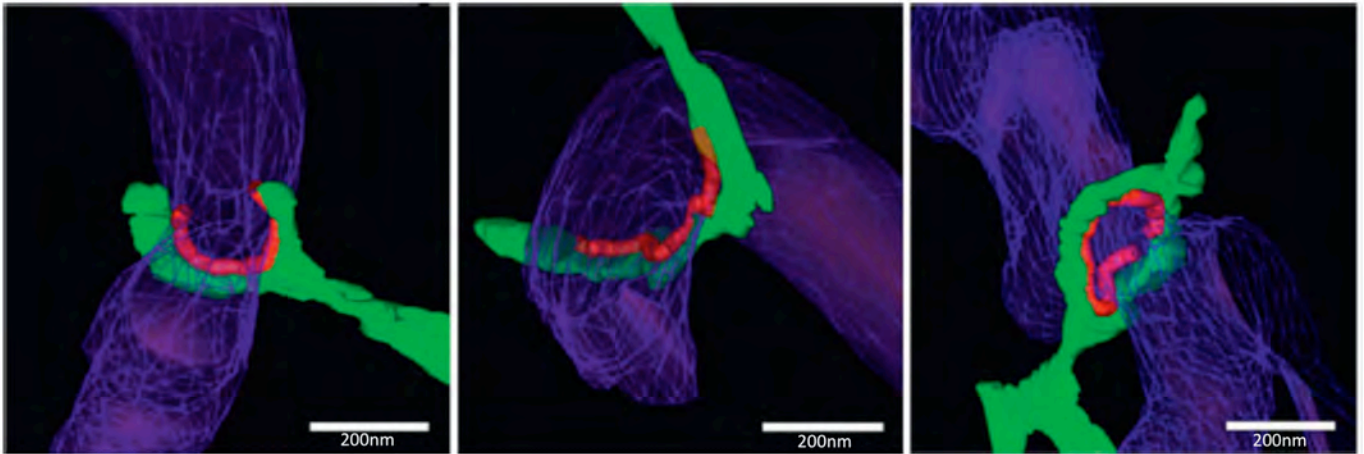


Figure 9 : Vue de MAM en 3 dimension par tomographie de microscopie électronique. Sur ces images, le RE est représenté en vert, les mitochondries en violet et les surfaces de contact, c'est à dire les MAM, en rouge. On constate que ces surfaces de contact peuvent représenter une partie variable (10 à 90 %) de la circonférence mitochondriale. Ces images illustrent parfaitement la nature des MAM : une région particulière du RE en contact avec les mitochondries. Il est important de préciser que l'on qualifie ici de contact un rapprochement inférieur à 30 nm. D'après Friedman et al. 2011 «ER tubules mark sites of mitochondrial division» *Science*.

3.2 Liaisons protéiques entre le RE et la Mitochondrie

La liaison physique entre le RE et les mitochondries est à la base de la découverte des MAM, en tant que fraction de la membrane du RE capable de cosédimenter avec les mitochondries. Cette liaison est assurée par des complexes protéiques (Figure 10).

3.2.1 Chez la levure : le complexe ERMES

Chez la levure, la liaison entre le RE et la mitochondrie est assurée par le complexe ERMES (*ER-Mitochondria Encounter Structure*). Ce complexe a été découvert grâce à un criblage pour identifier des mutants dans lesquels la liaison RE-mitochondrie est perdue mais peut être rétablie artificiellement par complémentation avec une protéine chimérique. Le complexe de liaison ainsi identifié se compose de protéines mitochondriales (Mdm10 et Mdm34), cytosolique (Mdm12) et du RE (Mmm1) (Kornmann et al., 2009). Le complexe ERMES est localisé en foci ponctuels le long de la surface mitochondriale. La protéine Miro (Mitochondrial Rho) GTPase GEM1 est capable d'interagir de façon dynamique avec ERMES pour réguler le nombre et la taille de ces complexes (Figure 10) (Kornmann et al., 2011). Le complexe ERMES est donc une

structure dynamique, capable de s'adapter au besoin physiologique de la cellule et impliquée dans les échanges lipidiques et calciques entre le RE et les mitochondries, l'importation des protéines mitochondriales, la réplication de l'ADN mitochondrial et la dynamique mitochondriale.

3.2.2 Dans la cellule animale

Le complexe ERMES n'est pas conservé dans les cellules animales. La liaison entre le RE et les mitochondries est assurée par d'autres complexes protéiques (Figure 10) :

- La protéine mitochondriale VDAC (*voltage dependent anion channel*) est liée à la protéine du RE IP3R (*Inositol triphosphate receptor*) via GRP-75 (*glucose regulated protein*). Le complexe VDAC/GRP-75/IP3R est impliqué dans le transfert de Ca^{2+} du RE vers la mitochondrie (Szabadkai et al., 2006).
- Les mitofusines 2 (Mfn2) présentes au niveau du RE peuvent former des complexes homotypiques ou hétérotopiques avec les Mfn1 ou Mfn2 présentes à la mitochondries (de Brito and Scorrano, 2008).
- La protéine mitochondriale Fis1 (*mitochondrial Fission-1 protein*) est liée à BAP31 (*B-cell receptor-associated protein*) présente au niveau du RE. Il a été montré que le complexe Fis1/BAP31 est impliqué dans l'apoptose induite par l'actinomycine D et l'étoposide dans les lignées cellulaires HeLa et HEK293T. Dans ce modèle, Fis1 permet de transmettre le signal apoptotique depuis la mitochondrie vers le RE en interagissant avec Bap31. Cette interaction facilite le clivage de BAP31 en p20BAP31, sa forme pro-apoptotique. La procaspase 8 est recrutée et activée au niveau des complexes Fis1/BAP31. Enfin, ce mécanisme permet la mise en place d'un signal d'amplification puisqu'il entraîne le relargage de Ca^{2+} par le RE, la surcharge de la mitochondrie en Ca^{2+} , la perte de potentiel membranaire mitochondrial et donc la perméabilisation de la membrane mitochondriale (Iwasawa et al., 2011).
- La protéine mitochondriale PTPIP51 (*protein-tyrosin phosphatase interacting protein*) est liée à la protéine VAPB (*vesicle-associated membrane protein-associated*) présente au niveau du RE. Ce complexe est impliqué dans les échanges calciques entre le RE et la mitochondrie. Des altérations du complexe VAPB/PTPIP51 suite à des mutations de VAPB pourraient être à l'origine des scléroses latérales amyotrophiques (ou maladie de Charcot) (De Vos et al., 2012).

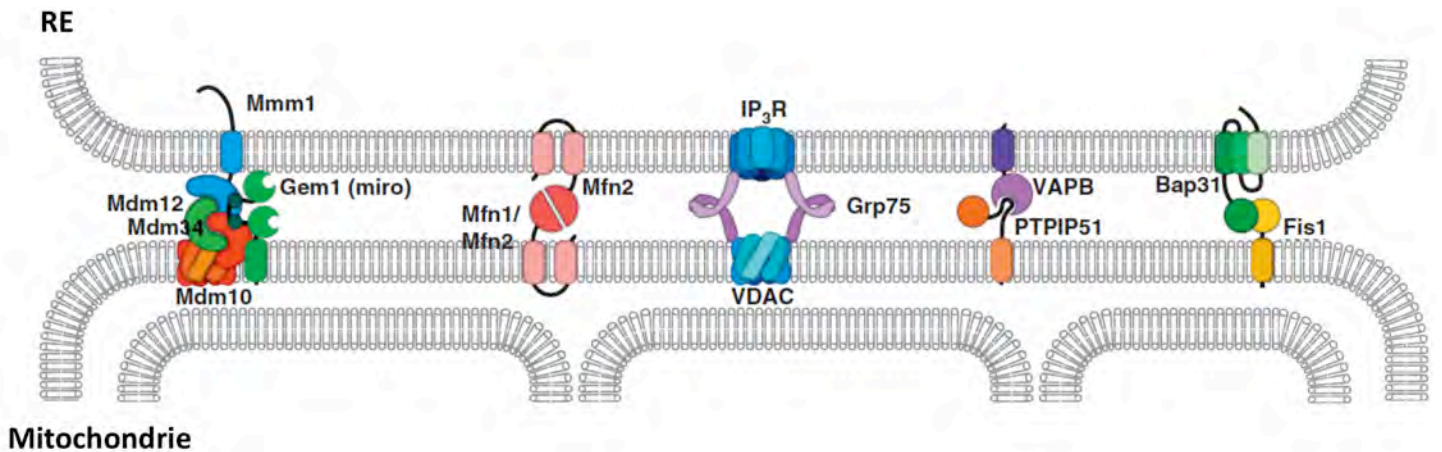


Figure 10 : Complexes protéiques assurant la liaison RE-Mitochondries au niveau des MAM.

Chez la levure, cette liaison est assurée par le complexe ERMES (*ER-mitochondria encounter structure*). Ce complexe est formé par des protéines mitochondriales (Mdm10 et Mdm34), cytosolique (Mdm12) et du RE (Mmm1). La GTPase Gem1 peut interagir de façon dynamique avec le complexe ERMES pour réguler son activité. Dans les cellules animales, la liaison RE-Mitochondries est assurée par plusieurs complexes protéiques différents. Une fraction de la mitofusine 2 (Mfn2) est associée au RE et peut interagir avec les Mfn1 ou 2 associées à la mitochondrie. Le canal calcique du RE IP3R interagit avec le pore mitochondrial VDAC via GRP-75. Cette interaction est impliquée dans les transferts de Ca^{2+} entre le RE et les mitochondries. Le complexe formé par VAPB et la protéine mitochondriale PTPIP51 est également impliqué dans les échanges de Ca^{2+} . La protéine du RE Bap31 interagit avec la protéine mitochondriale Fis1. Ce dernier complexe protéique est impliqué dans le recrutement de la caspase 8 et l'induction de l'apoptose. D'après Kornmann et al. 2013 « *The molecular hug between the ER and the mitochondria* » *Curr. Opin. Cell Biol.*

3.3 Implication des MAM dans les fonctions cellulaires

3.3.1 Synthèse des amino glycerophospholipides

La première fonction des MAM à être identifiée est leur implication dans la synthèse et le transport des lipides (Ardail et al., 1993). Les MAM contiennent une activité enzymatique égale ou supérieure à celle du RE pour les enzymes de synthèse de différents lipides (phospholipides, triacylglycerol, cholestérol, etc.) (Rusiñol et al., 1994). Les mécanismes d'interaction entre le RE et la mitochondrie sont particulièrement intéressants en ce qui concerne la synthèse des amino glycerophospholipides. Le rôle des MAM dans cette synthèse est en premier lieu évoqué suite à l'observation suivante : une fraction enrichie en mitochondries non purifiées, donc contenant des MAM, est capable de synthétiser de la phosphatidylserine (PS), de la phosphatidylethanolamine (PE) et de la phosphatidylcholine (PC). Une fois purifiées, c'est à dire débarrassées des MAM, les mitochondries ne sont plus capables de réaliser ces synthèses. Une partie des enzymes nécessaires (PS synthase et PE méthyltransferase) se trouvant dans les MAM (Vance, 1990). Il a également été observé que ces lipides sont transférés d'un compartiment à l'autre. La PS est transféré des MAM vers la mitochondrie et la PE de la mitochondrie vers les MAM (Achleitner et al., 1999). Le mécanisme complet de leur biosynthèse est aujourd'hui totalement élucidé. Il débute au niveau du RE avec la synthèse de PS qui est ensuite transférée dans la mitochondrie où elle est convertie en PE par la PS décarboxylase. La PE est alors transférée vers le RE et méthylée pour former la PC (Figure 11).

Le rôle des MAM est primordial dans cette voie de biosynthèse. La compartimentalisation des enzymes entre le RE et la mitochondrie rend indispensable les échanges de lipides entre ces deux organelles. Ces échanges sont possibles grâce au rapprochement des membranes au niveau des MAM.

Le transport de lipides entre les membranes est généralement assuré par des protéines spécialisées ou par des transports vésiculaires. Comme il a été dit précédemment ces mécanismes existent entre le RE et l'appareil de Golgi ou entre les lysosomes et la membrane plasmique mais n'ont jamais été décrits en ce qui concerne les échanges entre le RE et la mitochondrie. Le modèle des amino glycerophospholipides pourrait donc potentiellement s'appliquer à d'autres classes de lipides.

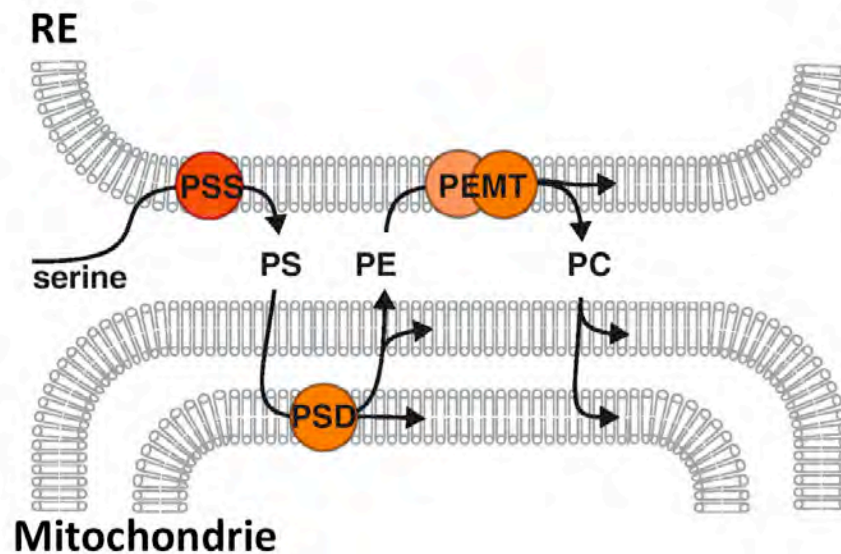


Figure 11 : Implication des MAM dans la synthèse des amino glycerophospholipides.

La synthèse *de novo* des amino glycerophospholipides nécessite une interaction étroite du RE et des mitochondries. Le processus commence par la synthèse de phosphatidylserine (PS) par la PS synthase (PSS) au niveau du RE. La PS est ensuite transférée dans la mitochondrie où elle est convertie en phosphatidyléthanolamine (PE) par la PS décarboxylase (PSD). Le PE est alors à son tour transféré vers le RE pour être transformé en phosphatidylcholine (PC) par la PE méthyltransférase (PEMT). La PC peut finalement rester dans le RE ou être transférée vers les membranes externe et interne de la mitochondrie dont elle est un composant essentiel. D'après Kornmann et al. 2013 « *The molecular hug between the ER and the mitochondria* » *Curr. Opin. Cell Biol.*

3.3.2 Synthèse et métabolisme des sphingolipides

Les MAM pourraient également jouer un rôle important dans la synthèse et le métabolisme des sphingolipides. Comme il a été dit précédemment, la génération de céramide a principalement lieu dans le RE (synthèse *de novo*) et au niveau de la membrane plasmique (hydrolyse de la sphingomyéline). Les différentes glycosylations du céramide et de ses métabolites ont ensuite lieu dans l'appareil de Golgi. Des études viennent cependant nuancer ce point de vue.

Il a été montré que les mitochondries purifiées et les MAM sont capables de synthétiser du céramide via une activité céramide synthase (Bionda et al., 2004). Cette capacité n'est pas étonnante pour les MAM en tant que régions particulières du RE. Par contre, cette

étude montre pour la première fois une implication directe des mitochondries purifiées dans la synthèse de céramide.

Les MAM contiennent également une activité enzymatique élevée en ce qui concerne des enzymes de synthèse des glycosphingolipides (céramide-glycosyltransférase et glucosyl-céramide-galactosyltransférase) (Ardail et al., 2003). Ces résultats suggèrent que les MAM pourraient fournir la mitochondrie en glycosphingolipides complexes selon un modèle très proche de celui décrit précédemment pour les amino glycerophospholipides.

3.3.3 Homéostasie calcique

Le rôle des MAM dans les échanges calciques a été évoqué pour la première fois il y a plus de 20 ans. Une étude montre que les mitochondries sont capables de capter le Ca^{2+} libéré par le RE. A l'époque les MAM étant à peine caractérisées, les auteurs parlent de microdomaines à forte concentration en Ca^{2+} et de l'importance de points de contacts entre les mitochondries et le RE pour contrôler cette concentration en Ca^{2+} intracellulaire (Rizzuto et al., 1993).

Le RE est le principal site de stockage de Ca^{2+} dans la cellule. On sait aujourd'hui que les flux de Ca^{2+} entre le RE et les mitochondries sont impliqués dans plusieurs processus cellulaires. D'abord dans la régulation du métabolisme énergétique puisque l'activité de plusieurs enzymes du cycle de Krebs est régulée par le Ca^{2+} (Denton, 2009). L'absorption des efflux calciques du RE par les mitochondries permet également d'éviter une accumulation de Ca^{2+} cytosolique toxique (Boitier et al., 1999). Enfin, l'accumulation de Ca^{2+} dans la matrice mitochondriale peut entraîner l'ouverture des mPTP et donc l'apoptose.

Les échanges de Ca^{2+} entre le RE et la mitochondrie impliquent l'interaction déjà évoquée entre IP3R et VDAC. Au niveau des MAM, suite à l'activation et à l'ouverture du canal calcique IP3R, le Ca^{2+} est libéré dans le cytosol. Il est alors immédiatement capté par VDAC (Kornmann, 2013). Ce mécanisme est rendu possible par la proximité des membranes du RE et des mitochondries au niveau des MAM. L'espace entre ces deux organelles est même parfois qualifié d'espace « quasi-synaptique » (Figure 12) (Csordas, 1999).

3.3.4 Morphologie et dynamique mitochondriale

Plusieurs liens existent entre les interactions ER/mitochondrie et la dynamique mitochondriale. Les MAM semblent impliquées dans la fission mitochondriale et dans les déplacements des mitochondries au sein de la cellule (Figure 12).

La protéine Miro est une GTPase Ca^{2+} -dépendante de la membrane mitochondriale externe. Des études chez la levure ont montré que la protéine Miro est impliquée dans le déplacement des mitochondries le long des microtubules et donc dans la répartition des mitochondries au sein de la cellule (Guo et al., 2005; Wang and Schwarz, 2009). L'homologue de Miro (Gem1) chez la levure fait parti du complexe ERMES (Stroud et al., 2011). Dans les cellules animales, la protéine Miro-1 se situe à la surface des mitochondries, préférentiellement au niveau des points de contacts entre le RE et les mitochondries (Kornmann et al., 2011).

La fission mitochondriale implique principalement la protéine Drp1 (*Dynamin-related protein*). Lors de la fission, on observe l'oligomérisation GTP-dépendante des protéines Drp1 en hélices autour des mitochondries. Mais peu de données permettent de comprendre comment Drp1 est recrutée au niveau de sites de fissions spécifiques. Plusieurs observations laissent supposer que les interactions entre le RE et les mitochondries sont impliquées dans la fission mitochondriale. Au niveau des MAM, le RE exerce une constriction des mitochondries et une diminution significative du diamètre mitochondriale. De plus, les sites de fissions des mitochondries se créent majoritairement au niveau des points de contact entre le RE et les mitochondries (Friedman et al., 2011). Certaines protéines du RE pourraient participer au mécanisme de fission. Le RE pourrait également jouer un simple rôle mécanique de constriction, permettant de diminuer le diamètre mitochondriale et de faciliter le recrutement de Drp1.

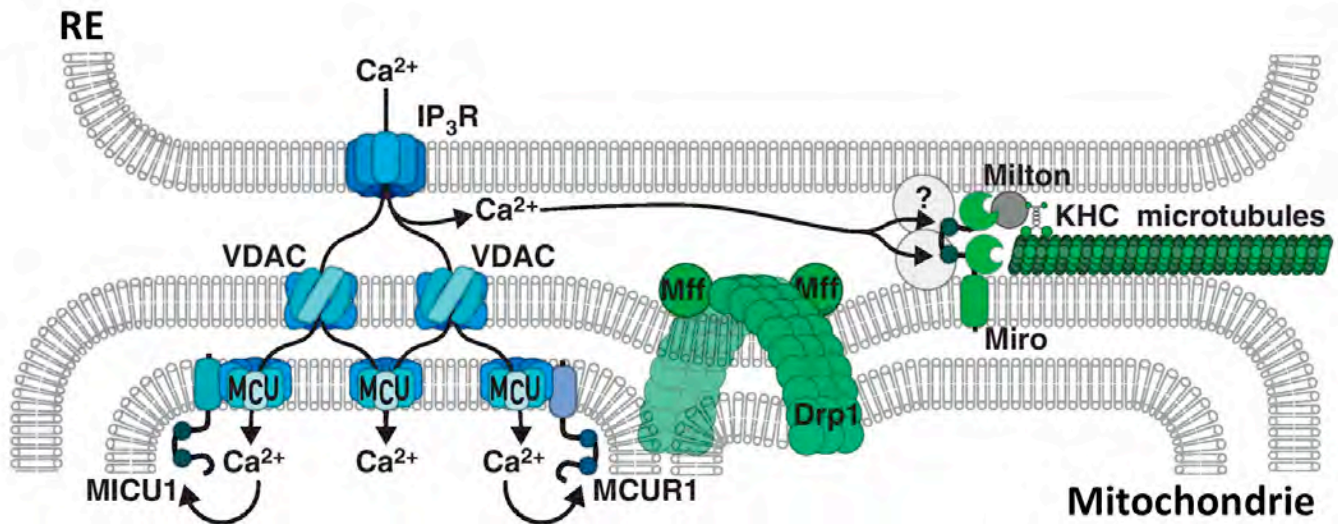


Figure 12 : Implication des MAM dans l'homéostasie calcique et dans la morphologie et la dynamique mitochondriale. Lors de l'ouverture des canaux calciques IP₃R le Ca²⁺ est libéré dans l'espace « quasi-synaptique » situé entre le RE et les mitochondries au niveau des MAM. Cet espace étant particulièrement étroit (moins de 20 nm) le Ca²⁺ peut être capté préférentiellement par les porines VDAC de la mitochondrie. Le Ca²⁺ est ensuite transféré vers la matrice mitochondriale via les canaux calciques de la membrane mitochondriale interne MCU (*Mitochondrial calcium uptake*). Les MAM sont également impliquées dans le mécanisme de fission mitochondriale. Le RE pourrait exercer un rôle direct de constriction des mitochondries au niveau des MAM pour faciliter l'initiation du processus de fission. De plus la protéine Mff (*Mitochondrial fission factor*) s'accumule au niveau des zones de contact ER-mitochondries et participe au recrutement de Drp1. Enfin les MAM participent à la régulation des mouvements des mitochondries le long des microtubules via l'interaction de la GTPase Ca²⁺ dépendante Miro (*Gem1* chez la levure) et des protéines Track1 et 2 (*Milton* chez la levure). D'après Kornmann et al. 2013 « *The molecular hug between the ER and the mitochondria* » *Curr. Opin. Cell Biol*

3.3.4 Autophagie

L'autophagie est un processus régulé de dégradation et de recyclage des composants intracellulaires. Ce mécanisme permet de maintenir l'homéostasie cellulaire lors de la privation en nutriments. Au cours de l'induction de l'autophagie, on observe la formation de vésicules à doubles membranes : les autophagosomes. Ces vésicules englobent alors une partie des organelles et du cytoplasme puis fusionnent avec les lysosomes ce qui entraîne la dégradation de leur contenu par protéase et hydrolyse. L'origine des autophagosomes est longtemps restée incertaine. En effet, plusieurs compartiments cellulaires ont été décrits comme sites de formation de ces vésicules : le RE (Axe et al., 2008; Hayashi-Nishino et al., 2009), la membrane plasmique (Cuervo, 2010) ou encore les mitochondries (Hailey et al., 2010).

Les MAM semblent jouer un rôle capital dans la formation des autophagosomes. Il a été montré que l'inhibition des contacts entre le RE et la mitochondrie (par extinction de

l'expression de MFN2) inhibe la formation des autophagosomes (Hailey et al., 2010). Une autre étude montre que lors de la privation de cellules en nutriments, les marqueurs des autophagosomes ATG14 et ATG5 se localisent au niveau des MAM (Hamasaki et al., 2013). Une autre observation impliquant les MAM dans l'autophagie est le transfert de PE des mitochondries vers les autophagosomes (Hailey et al., 2010). Ces données montrent que l'induction de l'autophagie par privation en nutriments nécessite la présence des contacts entre le RE et la mitochondrie. De plus, ces contacts doivent être fonctionnels pour permettre la formation des autophagosomes (implication du métabolisme des amino glycerophospholipides).

3.4 Implication des MAM dans les pathologies humaines

Il existe différentes pathologies impliquant des dysfonctions mitochondriales (cardiomyopathies, diabète, obésité, cancer et maladies neurodégénératives). Etant donné l'importance des MAM dans la régulation de la morphologie mitochondriale et de l'homéostasie calcique, de nombreuses études se sont intéressées à l'importance des MAM dans ces pathologies. Il est intéressant de constater que ces études ne permettent pas toujours de déterminer si les perturbations observées au niveau des MAM sont une cause ou une conséquence de la pathologie.

3.4.1 Maladies neurodégénératives

Les mitochondries sont notamment impliquées dans diverses pathologies neurodégénératives présentant un dysfonctionnement, voire une perte, de la fonction neuronale. Celle-ci est dépendante du potentiel membranaire engendré par les différences de concentrations ioniques de part et d'autre de la membrane plasmique grâce à l'action de pompes et de canaux ionique ATP-dépendants. Les neurones sont donc particulièrement dépendants du niveau de production d'ATP. L'état du réseau mitochondriale et la distribution des mitochondries le long des axones et des dendrites est cruciale pour la survie des neurones. La fragmentation du réseau mitochondrial est d'ailleurs un évènement précoce induit par différents stress neurotoxiques (Knott et al., 2008).

3.4.1.1 Maladie de Batten

La première implication des MAM décrite dans une pathologie humaine concerne la maladie de Batten (ou céroïde-lipofuscinose juvénile). Cette maladie est due à une mutation du gène CLN1 codant une palmitoyl thioestérase entraînant une accumulation anormale de lipides et de protéines dans le cytoplasme des neurones. On observe dans les foies de souris Mnd/Mnd, le modèle murin utilisé pour étudier cette maladie, une diminution importante du nombre de contacts RE/mitochondrie et de l'activité des enzymes de synthèse des phospholipides (Vance et al., 1997). Ces données suggèrent qu'un défaut de contact entre le RE et les mitochondries pourrait être impliqué dans cette maladie.

3.4.1.2 Maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est associée à la formation de plaques de β -amyloïdes extracellulaires au niveau de l'hippocampe et du cortex cérébrale et à la mort des neurones. La β -amyloïde est générée par le clivage d'APP (*Amyloid precursor protein*) par les présénilines 1 et 2, des protéines localisées au niveau de la membrane plasmique, du RE, des mitochondries et également au niveau des MAM.

Dans les cerveaux de patients atteints de cette maladie, on observe une augmentation de l'expression de Drp1 et de la fission mitochondriale (Wang et al., 2009).

Des études ont montré un lien entre l'augmentation de l'association ER/mitochondrie et l'apparition de la maladie d'Alzheimer. Les mutations du gène de la préséniline associées à la maladie entraînent une augmentation des contacts RE/mitochondries et des fonctions associées aux MAM, notamment de la synthèse des amino glycerophospholipides. Cependant, ces perturbations sont également observées chez les patients atteints de la forme sporadique de la maladie, c'est à dire sans mutation de la préséniline (Area-Gomez et al., 2012).

3.4.1.3 Maladie de Parkinson

Des études suggèrent que, dans la maladie de Parkinson, des altérations de la dynamique et de la fonction des mitochondries contribuent à la perte de neurones dopaminergiques au niveau de la substance noire (Youle and van der Bliek, 2012).

Il existe des formes familiales de la maladie associées à des mutations des gènes codant les protéines Parkin et PINK. Ces protéines sont impliquées dans le contrôle des niveaux d'expression de Drp1 et MFN2. Les mutations associées à une perte de fonction du couple Parkin/PINK entraînent une augmentation du taux de Drp1 et de la fragmentation mitochondriale (Wang et al., 2011; Yu et al., 2011). De plus, chez les souris déficientes en MFN2, on observe la perte de neurones dopaminergiques et l'apparition de troubles moteurs (Burman et al., 2012).

Etant donnée que les mitofusines sont impliquées dans la liaison ER/mitochondries et que les MAM participent à la régulation de la dynamique mitochondriale, ces données suggèrent que des altérations des MAM et de la dynamique mitochondriale pourraient contribuer à la perte de neurones dopaminergiques dans cette maladie.

3.4.2 Infections virales

Des études montrent que les protéines virales peuvent être importées du RE vers les mitochondries *via* les MAM. Plusieurs protéines virales sont ainsi partiellement localisées au niveau des MAM. C'est le cas par exemple de la protéine de l'exon 1 (UL37) du CMV (Williamson et al., 2011), d'une protéine du virus de l'hépatite C (*HCV core protein*) (Williamson and Colberg-Poley, 2009) ou encore de la protéine VPR (*Virus protein R*) du VIH (Huang et al., 2012). Certaines de ces protéines peuvent également perturber les fonctions des MAM. La protéine UL37 entraîne une augmentation du relargage de Ca²⁺ par le RE. VPR induit une diminution du niveau de MFN2 et une augmentation de la fragmentation mitochondriale.

D'autre part, la protéine STING (*Stimulator of interferon gene*) joue un rôle important dans la réponse immunitaire contre l'ADN virale et cette protéine est également localisée au niveau des MAM (Ishikawa et al., 2009)

Ces données suggèrent que les MAM pourraient être impliquées dans les mécanismes d'infections virales et participer au transport ou à la maturation des protéines virales.

3.4.3 Pseudoxanthome élastique

Cette pathologie est caractérisée par une perte des fibres élastiques pouvant affecter la peau, la rétine et les parois artérielles. Cette maladie a pour origine une mutation entraînant la perte de fonction de la protéine ABCC6 (*ATP-binding cassette subfamily C member 6*) et des anomalies structurelles et fonctionnelles des mitochondries. Une étude a montré que la protéine ABCC6 est localisée au niveau des MAM ce qui implique potentiellement une perturbation des MAM dans le développement de cette maladie (Martin et al., 2012).

3.4.4 Hypertension artérielle pulmonaire

L'hypertension pulmonaire est due à une hyperprolifération des cellules vasculaires. On observe également dans cette pathologie une altération de la structure du RE et des fonctions mitochondriales. Ces perturbations ont pour origine l'inhibition de l'apoptose par la protéine Nogo-B (Dromparis et al., 2010). L'expression de cette protéine est doublée au niveau des artères pulmonaires des patients atteints de cette maladie. Cette augmentation de l'expression de Nogo-B est corrélée avec une diminution des contacts RE/mitochondries et de plusieurs fonctions cellulaires associées aux MAM (échange calcique et transport de la PS) (Sutendra et al., 2011).

3.4.5 Diabète de type 2

Les MAM sont également impliquées dans les mécanismes de résistance à l'insuline. Une étude récente montre que des contacts RE/mitochondries fonctionnels sont indispensables à la signalisation cellulaire induite par l'insuline (Tubbs et al., 2014). Ces données sont confirmées chez la souris. L'extinction de l'expression de MFN2 entraîne une résistance à l'insuline et des perturbations des fonctions mitochondriales dans le foie et les muscles squelettiques, potentiellement à cause de la perte de communication entre RE et mitochondries (Sebastián et al., 2012). On retrouve d'ailleurs une diminution de l'expression de MFN2 chez les patients atteints de diabète de type 2 (Bach et al., 2005).

D'autres travaux montrent que le rôle des MAM dans le métabolisme du glucose implique les protéines AKT et mTORC2. En effet, ces protéines sont partiellement localisées au niveau des MAM (Betz et al., 2013). En réponse à l'insuline, AKT est capable

de phosphoryler IP3R et d'induire une augmentation de l'efflux calcique depuis le RE vers les MAM. Une diminution de l'activité d'AKT est d'ailleurs suffisante pour induire une résistance à l'insuline (Cho et al., 2001). L'insuline induit une augmentation de la localisation de mTORC2 au niveau des MAM ainsi qu'une augmentation des contacts entre le RE et les mitochondries (Betz et al., 2013).

Ces données suggèrent que les MAM pourraient jouer un rôle dans la régulation du métabolisme du glucose *via* MFN2 et le couple AKT/mTORC2.

3.5 Implication des MAM dans l'apoptose

De nombreuses données bibliographiques laissent supposer que les MAM sont également impliquées dans l'apoptose. D'abord *via* leur importance dans la dynamique mitochondriale et le statut calcique des mitochondries, deux phénomènes majeurs lors de l'induction de l'apoptose. Ensuite par leur capacité à fournir les mitochondries en sphingolipides impliqués dans la régulation des interactions entre les protéines de la famille Bcl-2. Les MAM permettent la création d'un environnement lipidique spécifique nécessaire à l'activation de Bax et Bak et donc à l'induction de l'apoptose (Chipuk et al., 2012).

Différentes caractéristiques de l'interaction entre le RE et les mitochondries peuvent varier au cours de l'apoptose : leur nombre au sein de la cellule, la distance qui sépare le RE et les mitochondries et enfin, la composition lipidique et protéique des MAM.

3.4.1 Nombre des contacts RE-Mitochondrie

Comme il a été dit précédemment, les contacts entre le RE et les mitochondries sont impliqués dans la modulation de la dynamique mitochondriale. Au cours de l'apoptose, on observe une fragmentation du réseau mitochondrial suite au recrutement de Drp1. Il a été montré que les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak sont alors colocalisées avec Drp1 (Karbowski et al., 2002). Bax et Bak sont d'ailleurs nécessaires à la fission mitochondriale induite par Drp1 (Wasiak et al., 2007). Il semblerait donc que les MAM, Drp1, Bax et Bak interagissent pour induire la fragmentation du réseau mitochondrial au cours de l'apoptose. L'inhibition de Drp1 entraîne une augmentation de la fusion mitochondriale et inhibe partiellement l'apoptose induite par la staurosporine (Frank et al., 2001). La fragmentation mitochondriale n'est donc pas uniquement une conséquence de l'apoptose mais pourrait être un mécanisme effecteur important au cours de la mort cellulaire. L'importance des MAM dans ce mécanisme de fission mitochondriale laisse supposer que le nombre de point de contacts entre le RE et les mitochondries pourrait varier au cours de l'apoptose (Hoppins and Nunnari, 2012; Vance, 2014).

3.4.2 Intensité (distance) des contacts RE-mitochondrie

Les échanges de Ca^{2+} entre le RE et les mitochondries sont également impliqués dans l'induction de l'apoptose. La distance qui sépare le RE des mitochondries semble directement influencer la quantité de Ca^{2+} captée par les mitochondries.

Au niveau des MAM, la distance qui sépare le RE et la membrane externe des mitochondries est de 9 à 16 nm. La diminution artificielle de cette distance (en dessous de 6 nm) entraîne l'augmentation des échanges de Ca^{2+} entre le RE et les mitochondries ce qui induit la surcharge calcique de la mitochondrie, sa perméabilisation et donc l'apoptose (Csordás et al., 2006). De la même façon, l'induction de l'apoptose par privation en sérum ou par traitement à la tunicamycine provoque la diminution de la distance entre le RE et les mitochondries et augmente la quantité de Ca^{2+} captée par les mitochondries (Csordás et al., 2006).

Dans les cellules saines, le contact ER-mitochondrie doit être suffisant pour permettre les échanges calciques indispensables à la production d'ATP. Au cours de l'apoptose, l'intensité de ce contact peut augmenter pour surcharger la mitochondrie en calcium et amplifier sa perméabilisation. L'intensité des contacts ER-mitochondrie est donc variable et régulée. L'identification des mécanismes permettant cette régulation pourrait donc nous aider à mieux comprendre le rôle des MAM dans l'apoptose

3.4.3 Nature des contacts ER-mitochondrie (composition des MAM)

Un autre paramètre important des MAM pouvant les relier à l'apoptose est leur composition. D'abord lipidique, puisqu'il a été montré récemment que les MAM sont impliquées dans l'activation des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak en fournissant aux mitochondries certains sphingolipides (Chipuk et al., 2012). Ces observations montrent que les contacts entre le RE et les mitochondries sont nécessaires à l'induction de l'apoptose. Mais la variation, au cours de l'apoptose, de la composition en sphingolipides dans les MAM, les mitochondries et le RE n'a jamais été décrite avec précision.

4 Objectifs de la thèse

Etant donné l'ensemble de ces observations, plusieurs pistes de recherche nous ont parues particulièrement intéressantes pour mieux comprendre le rôle des MAM et des sphingolipides au cours de l'apoptose.

La première partie du projet a donc reposée sur la mise au point d'une méthode de fractionnement cellulaire permettant de purifier les différentes fractions d'intérêt à partir de tissus murins ou de lignées cellulaires en culture. Une fois ces fractions obtenues nous nous sommes concentré sur l'analyse de leur composition en sphingolipides et en protéines de la famille Bcl-2.

La deuxième partie du projet a permis de caractériser avec précision un modèle d'induction de l'apoptose par la staurosporine dans une lignée cellulaire. Une attention particulière a été portée sur la cinétique des différents événements apoptotiques.

Une fois ces travaux de mise au point effectués, l'objectif principal du projet était de pouvoir analyser les variations de composition sphingolipidiques et la redistribution des protéines de la famille Bcl-2 au sein de ces fractions.

Un autre aspect potentiellement important dans le rôle des MAM repose sur les variations quantitatives des interactions entre le RE (MAM) et les mitochondries au cours de l'apoptose. Nous avons essayé de mesurer ces interactions par observation directe (microscopie électronique) ou par mesure des interactions protéiques à l'interface entre les MAM et les mitochondries.

Enfin, nous avons également étudié le rôle des protéines Bax et Bak dans la synthèse des sphingolipides.

Deuxième Partie

Matériel et Méthodes

5 Matériel et méthodes

5.1 Culture cellulaire

Deux lignées cellulaires de glioblastomes humains, U251 et U87, ont été utilisées au cours de nos travaux. Les cellules sont cultivées à 37°C en présence de 5 % de CO₂. Les cellules U251 et U87 sont cultivées en milieu DMEM à respectivement 4,5 g/L et 1 g/L de glucose. Les milieux sont enrichis de 10 % de sérum de veau foetal (SVF), d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine) et de glutamine (Tableau 1).

Lors des expériences d'induction de l'apoptose, les cellules sont traitées avec de la staurosporine à 0,5 mg/L (soit 1,05 µM).

Produit	Marque	Référence
DMEM (4,5 g/L de glucose)	Life Technologies™ Gibco®	21969-035
DMEM (1 g/L de glucose)	Life Technologies™ Gibco®	21885-025
SVF	Life Technologies™ Gibco®	10270-106
Pénicilline/Streptomycine	Life Technologies™ Gibco®	15140-122
Glutamine	Life Technologies™ Gibco®	25030-024
Trypsine	Life Technologies™ Gibco®	25200-056
Staurosporine	Santa Cruz Biotechnology®	Sc-3510A

Tableau 1 : Liste des produits de culture cellulaire

5.2 Immunoblot

Pour les expériences sur cellules entières, sans fractionnement subcellulaire, l'analyse par immunoblot est réalisée à partir de lysats protéiques. Les cellules sont trypsinées pendant 5 min à 37°C, centrifugées 5 min à 600 g, reprises dans du PBS (*Phosphate Buffer Saline*) à 4°C et de nouveau centrifugées 5 min à 600 g. Les culots ainsi obtenus sont lysés par addition volume à volume de tampon RIPA (Tris 50 mM, NaCl 0,15 M, SDS 0,1 %, Désoxycholate 0,1 %, NP-40 1 %, pH 8) supplémenté d'inhibiteurs de protéase. Les lysats sont incubés 30 min sur glace.

Pour l'analyse par immunoblot des fractions subcellulaires les fractions en suspension ne subissent pas de lyse chimique.

Les protéines sont dosées dans les lysats cellulaires ou dans les fractions subcellulaires par protocole BCA (*BiCinchoninic acid Assay*) (Interchim Uptima, ref. 40840A) puis dénaturées 5 minutes à 95°C en présence de β -mercaptoéthanol.

Les échantillons sont ensuite déposés sur un gel SDS/polyacrylamide qui permet l'isolation des protéines par électrophorèse. Les protéines sont ensuite transférées (transfert liquide) sur une membrane de PVDF (Polyvinylidene fluoride) pendant 90 minutes à 70 volts. La membrane est ensuite saturée pendant une heure dans du PBS/lait 5 %. Pour permettre la détection des protéines d'intérêt, la membrane est incubée toute la nuit à 4°C en présence d'un anticorps primaire (Tableau 2) puis une heure à température ambiante en présence d'un anticorps secondaire couplé à la HRP (*Horseradish peroxidase*). Les anti-corps secondaires (anti-souris, anti-lapin et anti-chèvre) sont tous utilisés au 1/10000. La détection du complexe protéine/anticorps est réalisée par addition du substrat de la HRP (Kit Clarity™ Western ECL Substrate, 170-5060, Bio-Rad™) et par analyse numérique de la chimiluminescence sur un appareil Chemidoc™ MP System (Bio-Rad™).

Anticorps	Marque	Référence	Dilution WB	Dilution IF
Actine	Millipore	MAB1501R	1/5000	
Bak	Pharmlngen™	556396	1/1000	
Bax	Pharmlngen™	554104	1/1000	
Bax	Enzo®	4F11		1/500
Bcl-2	Abcam®	Ab131448	1/1000	1/500
Bcl-xL	Santa Cruz Biotechnology®	sc 56021	1/1000	
Bid	R&D Systems®	AF860	1/500	
Calreticuline	US Biological	C1036	1/1000	
Cytochrome c	R&D Systems®	7H82C12	1/1000	
FACL4	Santa Cruz Biotechnology®	sc365230	1/1000	
Mcl-1	Santa Cruz Biotechnology®	sc819	1/500	
TOM 20	Pharmlngen™	612278	1/1000	1/100
TOM 22	Abcam®	Ab10436	1/1000	
VDAC	Sigma Aldrich®	V2139	1/1000	1/100

Tableau 2 : Liste des anticorps primaires pour WB et IF

5.3 Test activité caspases

Après traitement des cellules et extraction des protéines, l'activité des caspases est mesurée sur 15 µg de protéines à l'aide du kit *CaspACE Assay System (Promega)*. La quantification de l'activité caspase repose sur la mesure de la fluorescence émise par l'AMC (7-amino-4-méthylcoumarin) après clivage du substrat Ac-DEVD-AMC par les caspases. La fluorescence est mesurée toutes les 15 minutes. L'activité caspase est déterminée par la pente de la courbe de fluorescence en fonction du temps et exprimée en UA (unité arbitraire) par milligramme de protéines.

5.4 Microscopie

Pour toutes les expériences de microscopie, hors microscopie électronique, les cellules sont cultivées sur des lamelles de verre en plaque 24 puits. Après traitement, les lamelles sont lavées au PBS. Les cellules sont ensuite fixées avec du PFA (paraformaldéhyde) 4 % pendant 15 minutes à température ambiante. Les lamelles sont alors lavées à 6 reprises dans du PBS.

Pour les marquages en immunofluorescence, mitotracker ou P-LISA, la fluorescence est visualisée sur un microscope axiovert 200M (Zeiss, Le Pacq, France) possédant un module ApoTome (x63 et ouverture numérique de 1,4).

5.4.1 Immuno fluorescence

Après fixation, les cellules sont perméabilisées avec du PBS-SDS 0,1 % pendant 10 minutes et saturées en PBS BSA 3 % pendant 30 minutes à température ambiante. Les cellules sont ensuite incubées en présence d'un anticorps primaire (Tableau 2) pendant 1 heure à 37°C, puis d'un anticorps secondaire (anti-souris ou anti-lapin dilués au 1/500), couplé à un fluorochrome, pendant 30 minutes à température ambiante. Après chacune de ces étapes les lamelles sont lavées à 3 reprises en PBS. Enfin, les lamelles sont montées sur lame de verre à l'aide de *Prolong Gold® Dapi* (Life Technologies, ref. P-36931).

5.4.2 Mito tracker

Pour le marquage du réseau mitochondrial à l'aide de MTred (*Mito Tracker® Red CMXRos*, Life Technologies, ref. M-7512), les cellules sont traitées pendant 30 minutes à 37°C avec du DMEM contenant 150 nM de MTred. Les lamelles sont ensuite lavées en PBS, puis fixées et montées sur lame comme décrit précédemment.

5.4.3 Test de proximité par ligation *in situ* (P-LISA)

La technique de P-LISA permet de quantifier les interactions entre deux protéines au sein d'une cellule. Les deux protéines sont marquées avec des anticorps primaires provenant d'espèces différentes. Les anticorps secondaires sont couplés à une séquence

nucléotidique. Si les protéines d'intérêt sont assez proches, les séquences peuvent s'hybrider à une sonde, être amplifiées et marquées par fluorescence.

Après fixation, les cellules sont perméabilisées avec du PBS-SDS 0,1 % pendant 10 minutes. Les étapes suivantes (saturation, immunomarquage, hybridation, ligation, amplification et détection) sont réalisées selon les recommandations du fabricant (Olink Bioscience). Toutes les incubations sont réalisées en chambre humide. L'amplification et la détection se font à l'abri de la lumière. Les lamelles sont ensuite montées sur des lames de verre comme décrit précédemment.

Après lecture des lames au microscope, l'analyse est réalisée à l'aide du *plugin 3D counter* sur le logiciel ImageJ.

5.4.4 Microscopie électronique

Les images de microscopie électronique ont été réalisées à partir de cellules adhérentes ou sur des culots cellulaires. Les échantillons subissent d'abord 2 étapes de fixation en glutaraldéhyde 4 % puis en tetroxyde d'osmium 2 %. L'étape suivante est une déshydratation progressive dans plusieurs bains d'éthanol à 50 %, 70 %, 95 % et 100 %. Les échantillons sont alors imprégnés dans une résine Epon/éthanol pour permettre la réalisation de coupes. Les coupes sont ensuite déposées sur des grilles de cuivre et colorées à l'aide d'acétate d'urayle et de citrate de plomb. Les grilles sont observées sur un microscope électronique à transmission (Jeol Jem-1010).

5.5 Invalidation de l'expression de protéines par shRNA

Les expressions de Bax ou Bak ont été invalidées dans les lignées cellulaires U251 et U87 par shRNA. Les cellules ont été transduites avec des particules lentivirales Mission ® shRNA dirigées contre Bax (SHVRS NM_004324.3) et Bak (SHVRS NM_001188). Pour chaque protéine, cinq séquences sont testées. Les cellules sont ensuite sélectionnées à la puromycine (2 µg/ml) et les séquences entraînant la meilleure inhibition sont retenues. Des séquences non spécifiques (SHC 0001V et SHC 0002V) ont été utilisées comme contrôles négatifs.

5.6 Fractionnement subcellulaire

Les fractionnements subcellulaires par centrifugation différentielle sont réalisés à partir de cellules en culture, environ $150 \cdot 10^6$ cellules (soit 40 boîtes de culture de 10 cm) ou de foies de souris C57BL/6J (6 foies soit environ 7 g). Cette méthode permet d'obtenir 6 fractions (Tableau 3).

Fractions	Composition	Volume protocole cellules	Volume protocole foies
H	Homogénat cellulaire	3,5 mL Aliq. 50µL	28 mL Aliq. 100 µL
FM	Fraction Mitochondriale (non purifiée)	800 µL Aliq. 50 µL	2 mL Aliq. 200 µL
MP	Mitochondries Pures	60 µL	300 µL
MAM	Membranes Associées aux Mitochondries	200 µL	200 µL
RE	Réticulum endoplasmique	200µL	500 µL
Cyto	Cytosol	3 mL Aliq. 1 mL	10 mL Aliq. 1mL

Tableau 3 : Liste des fractions et volumes obtenus (ou aliquotés)

5.6.1 Extraction des mitochondries à partir de cellules en culture

Les cellules sont trypsinées, centrifugées à 600 g pendant 5 minutes et lavées 3 fois en PBS à 4°C. Les culots sont repris dans 1,5 mL de tampon ICell-1 à 4°C (Tableau 4). Les cellules sont alors broyées dans un polybroyeur verre/verre (*Potter-Elvehjem glass/glass*). L'efficacité de l'homogénéisation est contrôlée par comptage des cellules tout les 50 mouvements. A la fin de l'homogénéisation, soit environ 200 mouvements, 50 µL d'homogénat sont conservés. L'homogénat est ensuite centrifugé à 600 g pendant 5

minutes afin d'éliminer les cellules restées intactes et les noyaux. Le surnageant est centrifugé à 7000 g pendant 10 minutes. Le surnageant (SN*) est conservé pour isolation du RE et du cytosol. Le culot est repris dans 1 mL de tampon IBcell-2 (Tableau 4). Cette suspension est alors centrifugée à 10000 g pendant 10 minutes. Le culot, constitué des mitochondries (non purifiées pour l'instant) et notés FM (fraction mitochondriale), est repris dans 800 µL de tampon MRB. On aliquote 50 µL de la suspension FM.

5.6.2 Extraction des mitochondries à partir de foies ou de cerveaux de souris

Les souris sont sacrifiées par décapitation. Les foies ou les cerveaux sont prélevés et lavés à l'aide du tampon IBliver-3 (Tableau 4) puis découpés au scalpel. Les morceaux sont lavés avec le tampon IBliver-1 pour éliminer le sang puis transférés dans un polybroyeur verre/téflon motorisé (*Potter-Elvehjem glass/teflon*) avec 4 mL de tampon IBliver 1 par gramme de foie. L'homogénéisation est alors réalisée à 1500 rpm en 20 à 25 mouvements. On conserve 100 µL d'homogénat. L'homogénat est ensuite centrifugé à 740 g pendant 5 minutes afin d'éliminer les cellules restées intactes et les noyaux. Le surnageant est centrifugé à 9000 g pendant 10 minutes. Le surnageant (SN*) est conservé pour isolation du RE et du cytosol. Le culot est repris dans 10 mL de tampon IBliver-2. Cette suspension est alors centrifugée à 10000 g pendant 10 minutes. Le culot est repris dans 5 mL de tampon IBliver-3 et centrifugé à 10000 g pendant 10 minutes. Le culot, constitué des mitochondries (non purifiées pour l'instant) et notés FM (fraction mitochondriale), est repris dans 2 mL de tampon MRB. On aliquote 200 µL de la suspension FM.

5.6.3 Purification des mitochondries et isolation des MAM

Le reste du protocole est commun pour les extractions réalisées à partir de lignées cellulaires ou de tissus murins. Seuls les volumes de reprises sont différents (*cf.* Tableau 3).

La fraction mitochondriale est déposée délicatement sur 8 mL de tampon percoll dans un tube à ultra-centrifugation (Figure 13). On ajoute par dessus 1 mL de tampon MRB. La suspension de fraction mitochondriale doit rester sous forme de disque entre le tampon percoll et le tampon MRB. On réalise alors une ultra-centrifugation à 95000 g

pendant 30 minutes. Après cette centrifugation, la suspension de fraction mitochondriale, initialement déposée sur la partie supérieure du tube, est séparée en deux disques (Figure 13). Le disque supérieur est constitué des MAM et le disque inférieur des mitochondries purifiées. Ces deux fractions sont prélevées à l'aide d'une pipette pasteur et repris dans 10 mL de tampon MRB.

Les mitochondries purifiées sont centrifugées à 6300 g pendant 10 minutes. Le culot est repris en MRB (*cf.* volume Tableau 3).

Les MAM sont centrifugées à 6300 g pendant 10 minutes. Le surnageant est récupéré et centrifugé à 100000 g pendant 1 heure. Le culot de MAM est repris en MRB (*cf.* volume Tableau 3).

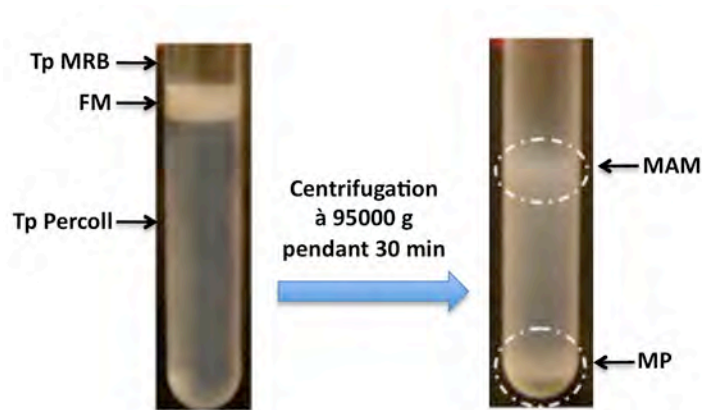


Figure 13 : Purification des mitochondries et isolation des MAM

5.6.4 Purification du RE et du cytosol.

Le RE et le cytosol sont purifiés à partir du surnageant noté SN* lors de l'extraction des mitochondries. Ce surnageant est centrifugé à 20000 g pendant 30 minutes. Le surnageant est récupéré et centrifugé à 100000 g pendant 1 heure.

Le surnageant, constitué du cytosol, est aliquoté. Le culot, composé du RE, est repris en MRB (*cf.* volume Tableau 3).

Tampon	Composition
IBcell-1	Mannitol 225 mM, Sucrose 75 mM, Tris-HCl 30 mM, EGTA 0,1 mM
IBcell-2	Mannitol 225 mM, Sucrose 75 mM, Tris-HCl 30 mM
IBliver-1	Mannitol 225 mM, Sucrose 75 mM, Tris-HCl 30 mM, EGTA 0,5 mM, BSA 0,5 %
IBliver-2	Mannitol 225 mM, Sucrose 75 mM, Tris-HCl 30 mM, BSA 0,5 %
IBliver-3	Mannitol 225 mM, Sucrose 75 mM, Tris-HCl 30 mM
MRB	Mannitol 225 mM, HEPES 5 mM, EGTA 0,5 mM
TpPercoll	Mannitol 225mM, HEPES 25 mM, EGTA 1 mM, Percoll 30 %

Tableau 4 : Liste des tampons de fractionnement subcellulaire (tous les tampons sont à pH 7,4)

5.7 Dosage lipidique

Les dosages de lipides ont été réalisés à partir de culots cellulaires ou de suspensions de fractions subcellulaires.

5.7.1 Extraction des lipides

Avant extraction des lipides, on ajoute dans chaque échantillon un mélange de standards internes de toutes les classes de sphingolipides à doser. Ce mélange se compose de céramide C17, sphingomyéline C17, S1P C17 Céramide-1-P C12, sphinganine C12 lactosilcéramide C12 et glucosylcéramide C12. Ces composés sont utilisés en tant que standards internes car ces longueurs de chaînes n'existent pas dans les échantillons biologiques.

L'extraction des lipides est réalisée en deux étapes. Les échantillons (culots ou suspensions) sont d'abord repris et vortexés dans 1,5 mL d'héxane/isopropanol (60:40, v/v) contenant 0,6 % d'acide formique, puis centrifugés à 3000 rpm pendant 5 minutes. On collecte alors la phase supérieure que l'on conserve dans un tube en verre. La phase inférieure est reprise et vortexée dans 1,5 mL de méthanol contenant 0,6 % d'acide

formique, puis centrifugées à 8000 rpm pendant 5 minutes. La phase supérieure ainsi obtenue est alors mélangée à la phase supérieure de la première étape. Ces phases sont alors évaporées sous flux d'azote à température ambiante. Les extraits lipidiques totaux sont resuspendus dans 150 µL d'héxane/isopropanol/acide formique.

5.7.2 Purification des lipides

Les lipides sont ensuite purifiés par classe, par technique de SPE (*Solid Phase Extraction*). Les extraits totaux sont déposés sur des colonnes de silice préconditionnées avec 2 mL d'hexane. Les différentes classes de lipides sont alors séparées par éluations successives en ajoutant différents mélanges de solvants sur les colonnes (Tableau 5).

Les fractions F1 et F3 ne sont pas conservées. Les F2, F4, F5 et F6 sont mises à évaporées sous flux d'azote et reprises en éluant A. Pour chaque espèce le volume d'éluant A est optimisé pour l'UPLC).

Fraction	Solvants	Volume	Lipides élués
F1	Héxane/Acétate d'éthyle (85:15)	1,4 mL	Lipides neutres
F2	Chloroforme/Méthanol (23:1)	1,6 mL	Céramides
F3	Diisopropyl éther/acide acétique (98:5)	1,8 mL	Acides gras libres
F4	Acétone/Méthanol (9:1,35)	2 mL	Glycosphingolipides Bases sphingoïdes
F5	Chloroforme/Méthanol (2:1)	2 mL	Sphingomyéline
F6	Chloroforme/Méthanol/Acétate d'ammonium (30:60:8) Acide formique 0,6 %	2 mL	Cer1P S1P
Eluant A	Héxane/Isopropanol (60:40) Acide formique 0,6 %		

Tableau 5 : Compositions des solvants utilisés pour la purification des lipides en SPE

5.7.3 Analyse par UPLC-ESI-MS/MS

Les sphingolipides sont quantifiées par UPLC-ESI-MS/MS (*ultra performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry*). Cette technique combine l'utilisation d'une chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse. La chromatographie (*H-Class UPLS system, Waters Corporation, Milford USA*) permet, au sein de chaque fraction isolée par SPE, de séparer les lipides par longueur de chaîne. Les conditions chromatographiques sont détaillées dans le tableau 5.2. L'analyse par spectrométrie de masse (*Waters Xevo TQD triple quadrupole*) permet la quantification des sphingolipides pour chaque classe et chaque longueur de chaîne.

La récolte et l'analyse des données sont effectuées à l'aide du logiciel *Mass Lynx software 4.1 (Waters, Manchester UK)*. L'intégration et la quantification des pics sont réalisées avec le logiciel *TargetLinks™ (Waters, Manchester UK)*.

Cette technique couplée à l'utilisation d'une gamme pour chaque classe de sphingolipides et des standards internes permet d'obtenir une quantification précise et reproductible. L'ensemble des standards internes et des standards utilisés pour la gamme proviennent d'Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA).

Liste des standards utilisés pour la gamme étalon :

- Céramide : C14:0, C16:0, C18:0, C18:1, C20:0, C24:0 et C24:1
- Sphingomyéline : C16:0, C18:0, C18:1, C24:0 et C24:1
- Glucosyl céramide : C16:0, C18:0, C18:1 et C24:1
- Lactosyl céramide : C16:1, C24:0 et C24:1
- Sphingosine, Sphinganine et S1P : C18:0 et C18:1

La composition de la gamme étalon est détaillée dans le tableau 5.3.

Une solution de standards internes composée d'un mélange de 40 µL de céramide C17:0 à 1 µM, 40 µL de sphingomyéline C17:0 à 10 µM, 10 µL de S1P C17:0 à 5 µM, 40 µL de sphingosine C17:0 à 1 µM, 40 µL de lactosyl céramide C12:0 à 1 µM et 40 µL de glucosyl céramide C12:0 à 1 µM est ajoutée à chaque échantillon biologique avant l'extraction lipidique.

Composés	Volume d'injection (µL)	Temps (min)	Débit (mL/min)	Eluant A (%)	Eluant B (%)
Céramide	5	0.00	0.6	5	95
		4.00	0.6	2	98
		4.10	0.6	5	95
		6.00	0.6	5	95
Sphingomyéline	2	0.00	0.6	5	95
		6.00	0.6	1	99
		6.10	0.6	5	95
		7.50	0.6	5	95
S1P / Cer1P	5	0.00	0.5	30	70
		5.00	0.5	0	100
		6.50	0.5	0	100
		7.00	0.5	30	70
		8.00	0.5	30	70
		8.5	0.5	0	100
		10.00	0.5	0	100
		10.50	0.5	30	70
		11.00	0.5	30	70
		11.50	0.5	0	100
		13.00	0.5	0	100
13.50	0.5	30	70		
14.00	0.5	30	70		
Glucosyl Céramide Lactosyl Céramide Sphingosine Sphinganine	5	0.00	0.6	20	80
		1.00	0.6	15	85
		1.10	0.6	10	90
		4.00	0.6	0	100
		5.00	0.6	0	100
		5.10	0.6	20	80
		6.00	0.6	20	80

Tableau 5.2 : Détails des conditions chromatographiques

Les valeurs indiquées dans ce tableau correspondent aux quantités injectées dans la colonne de chromatographie.

Composés	G0	G1	G2	G3	G4	G5
Céramide (pmol)	0	0.075	0.25	0.75	3	6.25
Sphingomyéline (pmol)	0	1	2	3	4	5
S1P (pmol)	0	1.6	3.33	5.83	8.33	11.6
Cer1P (pmol)	0	1.6	3.33	5.83	8.33	11.6
Glucosyl céramide (pmol)	0	0.075	0.25	0.75	3	6.25
Lactosyl céramide (pmol)	0	0.075	0.25	0.75	3	6.25
Sphingosine (pmol)	0	0.075	0.25	0.75	3	6.25
Sphinganine (pmol)	0	0.075	0.25	0.75	3	6.25

Tableau 5.3 : Détails de la composition de la gamme étalon
 Les éluant A et B sont respectivement de l'eau et du méthanol, additionnés d'acide formique à 1% et de formiate d'ammonium à 5 mM

5.8 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel graphpad prism®. Selon les expériences, on effectue un t-test de Student ou une analyse de variance « ANOVA » suivie d'un post-test de Tuckey. Un $p < 0,05$ est considéré comme significatif.

Troisième Partie

Résultats

6 Résultats

6.1 Caractérisation des MAM

6.1.1 Observation directe des MAM par MET

La première étape de ce travail a été de mettre en évidence l'existence de contacts entre le RE et les mitochondries dans notre modèle cellulaire. Des cellules U251 ont été observées en microscopie électronique à transmission (MET). Les mitochondries sont facilement identifiables sur ces images. Le RE apparaît sous la forme de tubules plus ou moins longs, en fonction de l'incidence de coupe. On peut également distinguer de nombreux ribosomes à la surface des tubules du RE (Figure 14). On remarque des zones de rapprochement du réseau de RE et de la membrane mitochondriale externe (Figure 14). La fréquence de ces contacts entre le RE et les mitochondries est très variable selon les champs observés.

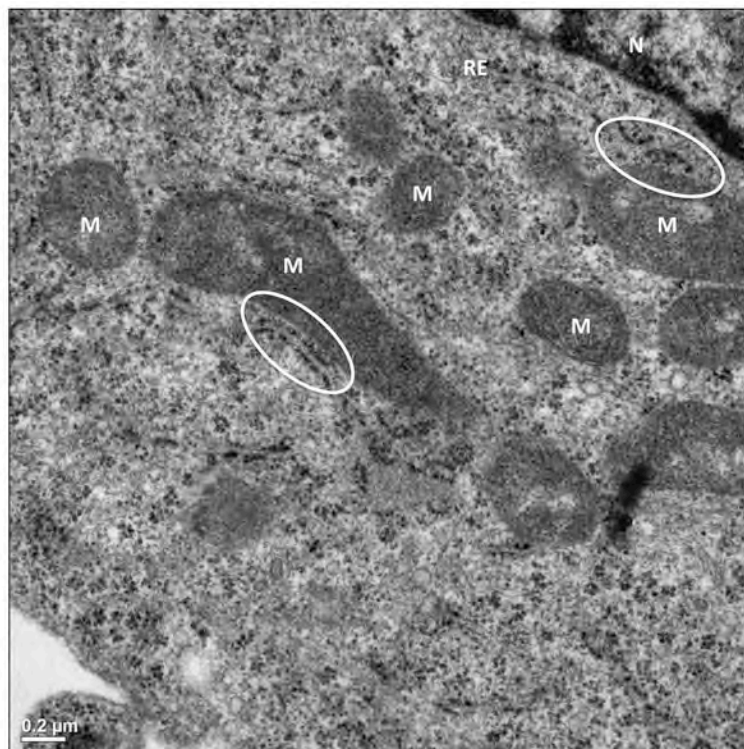


Figure 14 : Observation de cellules U251 en MET

Sur cette image, on distingue une partie du noyau (N), de nombreuses mitochondries (M) et des tubules du RE. On observe également des points de rapprochement entre les mitochondries et les tubules du RE (cercles blancs).

A un grossissement supérieur, on constate qu'au niveau des points rapprochement la distance entre le RE et la membrane mitochondriale externe est de l'ordre de seulement quelques nanomètres (Figure 15). On peut observer sur l'image présentée ici une diminution du nombre de ribosomes au niveau de la zone de contact (Figure 15 A). On remarque également que le tubule du RE d'épaisseur relativement stable, semble subir une déformation au contact de la mitochondrie (Figure 15 B).

Les images de microscopie électronique présentées doivent être considérées comme des illustrations de structures existantes dans les cellules. Pour des raisons pratiques (préparations des échantillons, temps d'acquisitions et de traitement des images, variabilité des structures observées en fonction de l'incidence de coupe) cette technique ne nous a pas permis de réaliser une étude quantitative des interactions entre le RE et les mitochondries. Par contre elle met clairement en évidence l'existence de ces contacts dans notre modèle cellulaire.

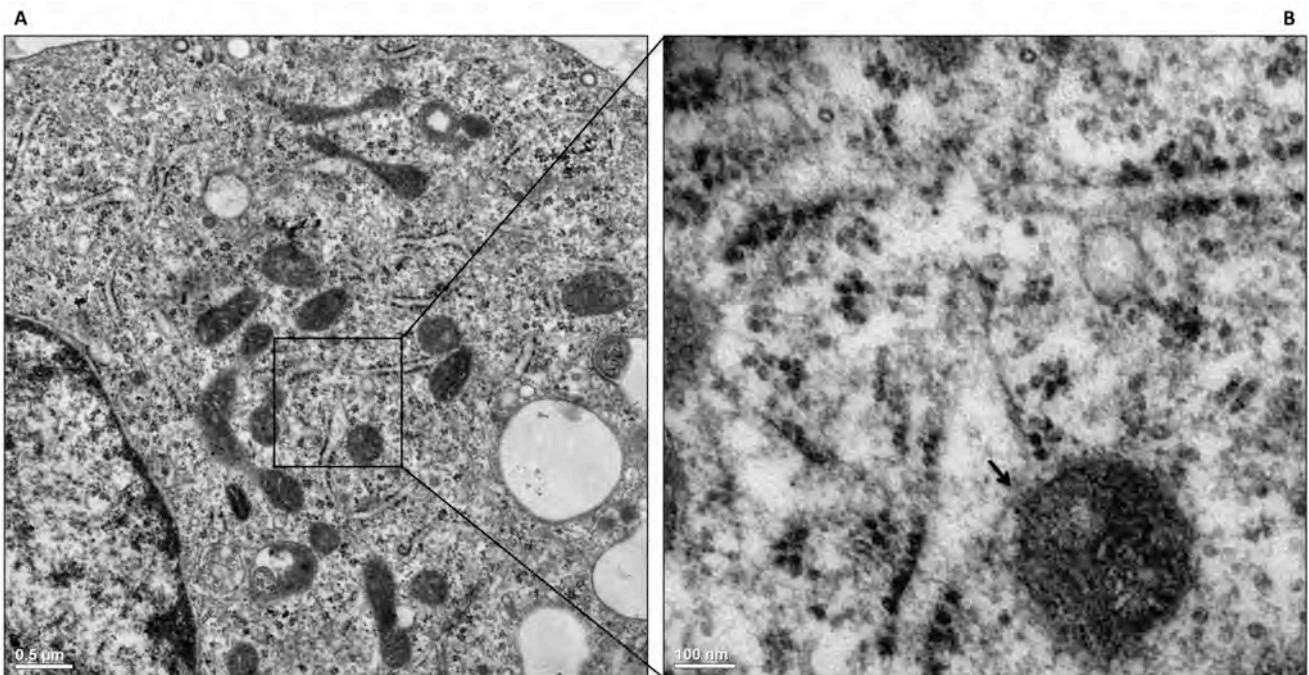


Figure 15 Observation de cellules U251 en MET

(A) On retrouve sur cette image les structures (noyaux, mitochondries et RE) déjà évoquées dans la figure précédente. (B) A un grossissement plus élevé, on peut observer une déformation d'un tubule du RE au contact de la mitochondrie. Les deux organites ne sont alors séparés que de quelques nanomètres (flèche noire).

6.1.2 Mise au point d'une méthode de fractionnement subcellulaire

L'étude des MAM nécessitait ensuite la mise au point d'une méthode de fractionnement subcellulaire. Nous avons pour cela adapté un protocole de centrifugation différentielle (Wieckowski et al., 2009) permettant de séparer 6 fractions subcellulaires, à partir de foies ou de cerveaux de souris ou encore de lignées cellulaires en culture :

- Un homogénat cellulaire, contenant l'ensemble des cellules éclatées ou non et leur contenu (H).
- Une fraction mitochondriale, composée des mitochondries sédimentées à 10 000 g (FM). Ces mitochondries sont donc toujours associées aux MAM.
- Une fraction de mitochondries purifiées sur un gradient de percoll (MP). Ces mitochondries ne sont plus associées aux MAM.
- Une fraction de MAM obtenue suite à la purification des mitochondries (MAM).
- Une fraction de réticulum endoplasmique (RE).
- Une fraction de cytosol (Cyto).

Une fois ces fractions isolées, leurs compositions sont analysées par WB. Cette analyse permet de contrôler la pureté des fractions. On utilise pour cela des marqueurs connus pour être associés aux mitochondries (VDAC, cytochrome c, TOM20) ou au RE (FACL-4, calréticuline).

Il est important de préciser que l'on dépose sur gel une quantité équivalente de protéines totales pour chaque fraction (30 µg pour les foies et le SNC et 10 µg pour les cellules). Ne disposant pas de marqueurs de charge communs à toutes les fractions, l'analyse repose sur la comparaison de l'expression de plusieurs marqueurs au sein d'une même fraction.

En ce qui concerne les fractions isolées à partir d'organes de souris, foies ou SNC (Figure 16 A et B), on constate que la fraction FM est enrichie en marqueurs mitochondriaux et en marqueurs du RE. Après purification, la fraction MP contient une proportion équivalente de marqueurs mitochondriaux mais les marqueurs de RE ont été presque totalement éliminés. Les fractions de MAM et de RE contiennent comme attendu des marqueurs de RE. Il est intéressant de constater que la protéine VDAC, utilisée en tant que marqueur mitochondrial est enrichie au niveau des MAM. Il ne semble pas s'agir d'une contamination puisque la fraction de MAM ne contient pas d'autre marqueur mitochondrial (Figure 16 A et B). Il a été montré que VDAC est impliqué dans les

liaisons protéiques entre les mitochondries et les MAM. On peut alors émettre l'hypothèse que lors de la séparation mécanique des MAM et des mitochondries sur gradient de percoll, VDAC puisse être indifféremment arraché du côté MAM ou du côté mitochondrie.

En ce qui concerne les fractions isolées à partir de cellules U251 (Figure 16 C), les résultats sont quasiment identiques. Les marqueurs mitochondriaux sont localisés au niveau des fractions FM et MP. Les marqueurs du RE sont localisés au niveau des fractions FM, MAM et RE.

L'analyse de ces marqueurs protéiques permet de valider le protocole de fractionnement subcellulaire. La fraction FM contient un mélange de marqueurs mitochondriaux (VDAC, Tom20, cytochrome C) et du RE (FACL-4, calréticuline), montrant que les mitochondries sont alors liées à une fraction du RE : les MAM. La purification de la fraction FM en fraction MP permet de séparer ces MAM tout en conservant ou en enrichissant les marqueurs mitochondriaux. Enfin, la fraction de MAM contient majoritairement des marqueurs du RE, mais elle peut également contenir des protéines impliquées dans la liaison MAM/Mito (VDAC).

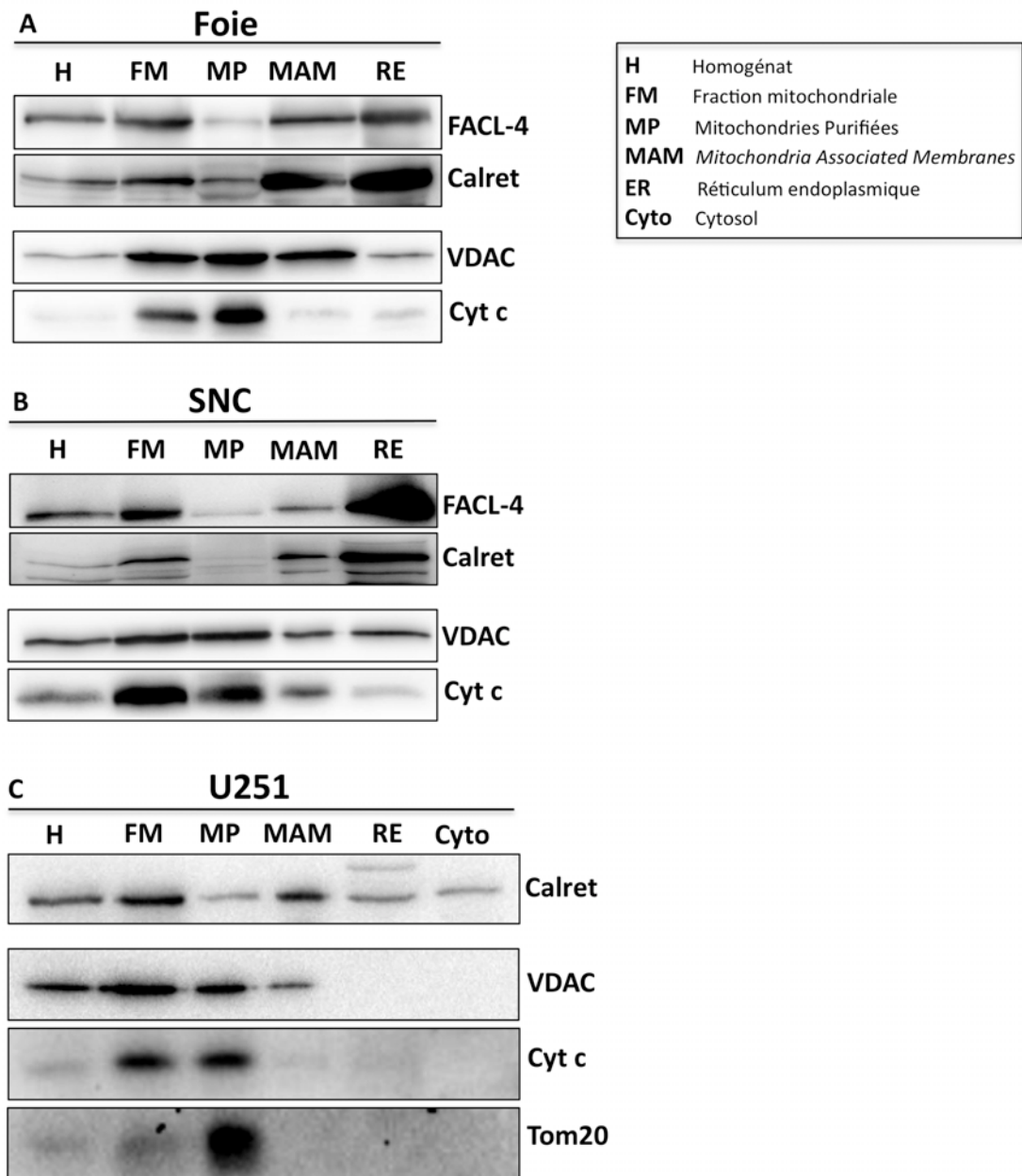


Figure 16 : Caractérisation des fractions subcellulaires. Après fractionnement subcellulaire, 30 µg pour les foies (A) et SNC (B) ou 10 µg pour les cellules (C) de protéines totales de chaque fraction sont déposées sur gel SDS-PAGE. On compare ensuite au sein de chaque fraction les proportions de marqueurs du RE (calréticuline, FACL-4) et de marqueurs mitochondriaux (VDAC, cytochrome c, TOM20). (Résultats représentatifs d'au moins 3 expériences indépendantes)

6.1.3 Analyse de la composition sphingolipidique des fractions

Nous avons ensuite voulu savoir quelle était la composition en sphingolipides des fractions subcellulaires. La spectrométrie de masse nous permet de doser plusieurs classes de sphingolipides (céramide, sphingomyéline (SM), sphingosine, sphinganine, glucosyl céramide, lactosyl céramide S1P et Cer1P). On peut également doser spécifiquement la quantité de chaque longueur de chaîne de ces espèces. On remarque cependant que toutes les variations observées entre les fractions concernent l'ensemble des longueurs de chaîne de façon relativement homogène. Pour faciliter la présentation et l'analyse des résultats, nous avons donc choisi d'exprimer les quantités de « lipides totaux » en additionnant toutes les longueurs de chaînes au sein d'une même classe.

Dans les fractions de foie de souris (Figure 17), le céramide et la sphingomyéline sont majoritairement présents au niveau des MAM et du RE. On constate d'ailleurs que la purification de la fraction FM entraîne une diminution du niveau de céramide et de SM dans la fraction MP.

La sphingosine est majoritairement présente au niveau des mitochondries (fractions FM et MP). La sphinganine est présente dans les mitochondries, dans les MAM et légèrement dans le RE. En ce qui concerne les formes glycosylées du céramide, on constate que le glucosyl céramide est majoritairement exprimé au niveau des MAM alors que le lactosyl céramide est présent dans les mitochondries et les MAM.

Toutes ces molécules sont hautement hydrophobes il est donc logique de les retrouver réparties dans les différentes fractions membranaires alors qu'elles sont à peine détectables dans le cytosol (Figure 17).

Enfin, la S1P et le Cer1P, détectables en très faibles quantités dans ces fractions, sont en dessous du seuil de quantification et ne sont donc pas présentées ici.

Comme il a été dit précédemment, si on étudie le détail des différentes longueurs de chaînes, on constate qu'il n'y a pas de variation spécifique d'une longueur de chaînes par rapport à une autre entre les fractions. Ces longueurs de chaînes sont plus ou moins exprimées, mais en conservant un ratio relativement stable entre chaque fraction (Tableau 6).

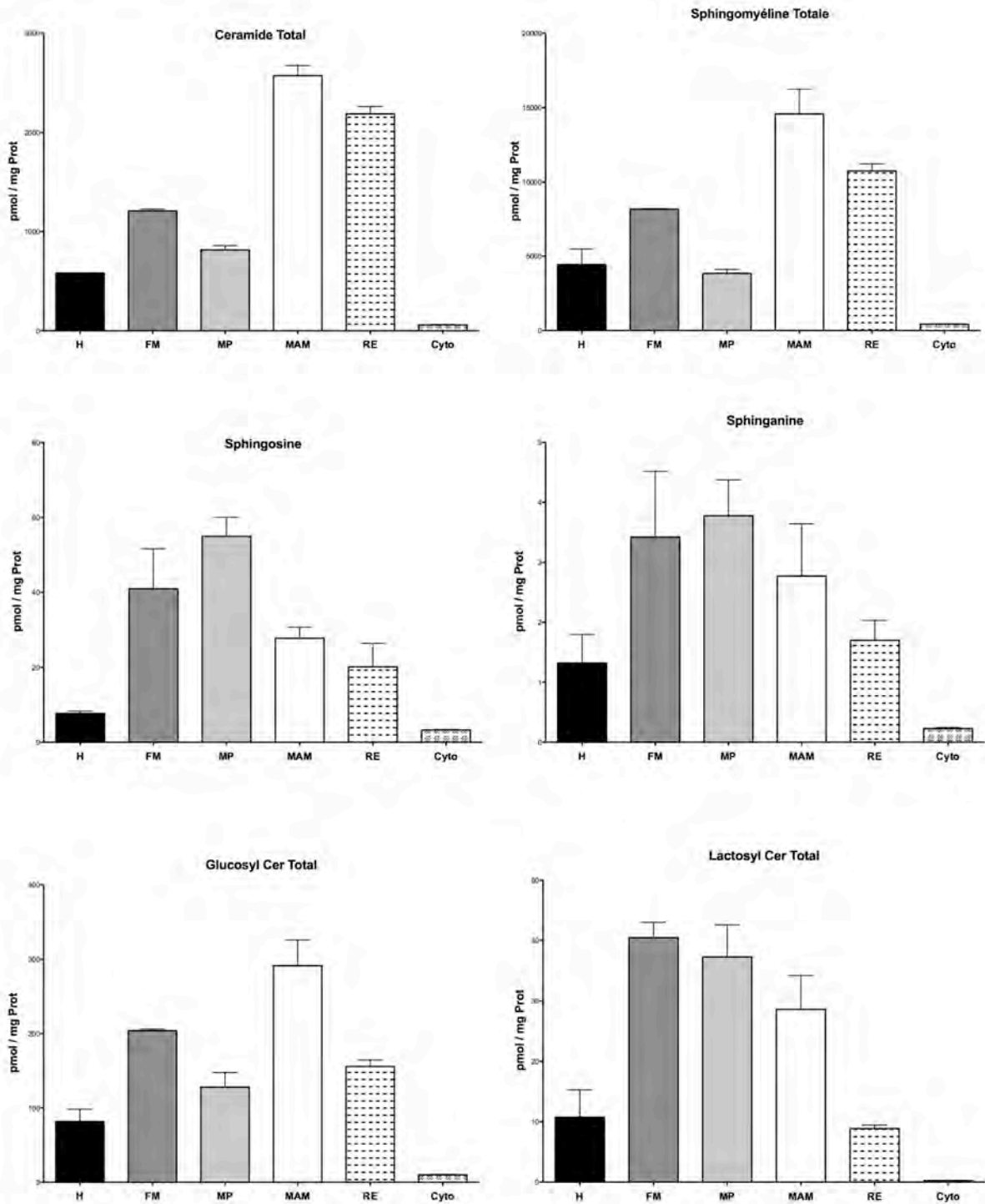


Figure 17 : Composition en sphingolipides des fractions de foie de souris (C57BL/6).

La composition en sphingolipides dans les fractions est analysée par UPLC-MS. Pour chaque fraction les lipides sont dosés dans 50 μ L de suspension. Les résultats sont ensuite exprimés en pmol de lipides par mg de protéines. Cette technique permet le dosage du céramide, de la sphingomyéline, de la sphingosine, de la sphinganine, du glucosyl céramide et du lactosyl céramide. Pour chaque classe de sphingolipides. Pour les céramides, SM, glucosyl et lactosyl céramides, les résultats représentent le total des longueurs de chaîne additionnées. Le détail du dosage pour les différentes longueurs de chaînes est présenté dans le tableau 6. (Moyenne \pm S.E.M, n=3)

Ceramide	H		FM		MP		MAM		RE		Cyto	
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
C14:0	4,87	1,61	7,11	1,25	9,10	3,96	4,72	1,49	10,47	2,07	0,51	0,37
C16:1	1,25	0,58	1,98	0,28	3,72	1,10	2,57	0,60	1,43	0,41	0,85	0,42
C16	38,76	12,63	78,41	10,11	112,00	34,92	58,63	17,82	97,24	13,90	3,51	0,52
C18:1	0,93	0,31	2,03	0,27	3,84	1,07	0,29	0,29	1,13	0,29	0,19	0,19
C18	32,37	7,77	137,45	28,70	144,17	22,86	204,34	56,83	54,82	8,11	152,20	34,72
C20:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20	1,64	0,60	4,09	0,64	8,86	4,07	2,81	0,54	6,05	1,34	0,25	0,25
C22:1	1,09	0,38	2,27	0,58	4,08	1,88	1,35	0,29	4,24	0,49	0,00	0,00
C22	7,59	2,52	18,14	2,10	35,72	11,37	12,84	4,17	25,24	4,06	1,30	0,05
C24:1	123,55	41,27	258,84	29,87	445,91	131,01	173,11	48,49	358,68	36,25	11,39	2,48
C24	40,53	14,50	84,53	7,12	131,50	35,35	57,68	13,29	120,36	13,37	6,17	1,17

SM	H		FM		MP		MAM		RE		Cyto	
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
C14:0	317,93	68,99	1464,30	106,82	593,72	131,79	1608,66	64,32	993,28	135,61	21,61	10,82
C16:1	376,22	81,26	1708,56	97,20	672,38	123,04	1852,92	28,60	1135,45	158,04	36,65	3,90
C16	4653,71	880,03	22298,32	2219,49	9495,85	1969,88	24336,04	714,99	13682,74	1602,20	906,61	389,91
C18:1	112,37	25,73	470,80	45,54	192,90	24,54	513,99	23,53	307,04	24,20	6,50	3,58
C18	422,00	79,76	2019,36	88,37	981,44	183,30	2030,76	31,16	1152,21	137,07	119,18	73,24
C20:1	18,76	5,59	74,43	10,07	35,55	3,01	65,03	8,90	51,85	8,20	0,00	0,00
C20	81,09	19,07	406,08	35,36	157,10	22,46	382,61	39,81	223,89	32,96	57,25	54,12
C22:1	116,03	18,77	529,34	34,78	224,42	28,59	543,24	31,37	315,91	46,55	19,85	14,53
C22	204,01	40,39	1108,36	132,84	475,91	96,14	1014,94	141,00	551,23	78,40	22,84	13,53
C24:1	1656,56	257,77	8205,66	1135,30	3683,24	932,79	8478,13	442,03	4878,83	917,29	385,63	170,81
C24	371,86	53,23	2049,34	333,96	898,11	235,67	1839,27	232,73	1096,05	221,38	368,50	323,24

Glucosyl Cer	H		FM		MP		MAM		RE		Cyto	
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
C14:0	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00
C16:1	0,51	0,13	2,86	0,27	1,73	0,31	1,99	0,03	1,76	0,04	0,00	0,00
C16	50,62	11,05	252,43	3,77	199,79	18,40	197,40	12,31	127,85	9,44	4,15	0,40
C18:1	0,14	0,08	0,64	0,33	0,72	0,36	0,31	0,31	0,25	0,12	0,00	0,00
C18	3,98	1,03	21,57	1,23	17,76	2,21	18,60	2,38	9,04	0,81	0,12	0,12
C20:1	0,07	0,07	0,00	0,00	0,30	0,19	0,07	0,07	0,11	0,09	0,00	0,00
C20	1,12	0,18	6,38	0,26	5,73	0,50	5,74	0,39	2,14	0,07	0,04	0,04
C22:1	5,86	1,29	32,69	2,48	28,52	1,77	24,07	2,45	12,70	1,29	0,17	0,17
C22	0,25	0,17	1,28	0,66	1,37	0,69	0,89	0,49	0,45	0,23	0,01	0,01
C24:1	44,09	8,69	255,23	10,99	242,01	13,46	166,90	16,72	99,79	8,43	3,53	0,53
C24	30,63	7,12	154,09	11,89	126,75	4,81	111,96	10,42	84,62	7,46	2,02	0,38

Lactosyl Cer	H		FM		MP		MAM		RE		Cyto	
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
C14:0	1,13	0,55	4,83	1,51	1,72	0,51	4,31	0,90	3,51	0,51	0,00	0,00
C16:1	0,06	0,06	0,28	0,28	0,07	0,07	0,50	0,29	0,25	0,12	0,00	0,00
C16	55,57	25,53	240,49	63,68	101,18	22,27	263,90	54,47	176,60	33,99	3,99	1,49
C18:1	0,64	0,35	1,87	0,64	0,92	0,14	1,19	0,75	1,17	0,22	0,00	0,00
C18	6,21	3,04	28,88	9,89	12,97	3,15	36,23	10,41	16,44	3,91	0,54	0,54
C20:1	0,01	0,01	0,10	0,10	0,01	0,01	0,07	0,07	0,04	0,04	0,00	0,00
C20	0,33	0,14	1,61	0,42	0,94	0,15	2,68	0,38	0,87	0,10	0,00	0,00
C22:1	0,31	0,12	1,34	0,49	0,35	0,35	1,47	0,74	0,66	0,20	0,00	0,00
C22	3,08	1,17	17,18	3,59	8,34	1,95	25,20	4,28	8,62	1,52	0,24	0,24
C24:1	34,72	11,85	203,00	54,79	115,16	30,89	320,84	78,76	103,84	21,41	5,83	2,08
C24	19,11	7,16	89,54	14,31	42,22	6,60	118,84	16,18	57,39	5,01	1,80	0,55

Tableau 6 : Composition en sphingolipides des fractions de foie, détails des longueurs de chaînes.
La composition des fractions est ici détaillée avec la quantité (en pmol par mg de protéine) de chaque longueur de chaîne carbonée pour les céramides, SM, lactosyl et glucosyl céramide.

La même analyse a également été réalisée sur les fractions subcellulaires de cellules U251 (Figure 18). On constate que la composition en sphingolipides des fractions de U251 est en partie différente de la composition des fractions de foie de souris.

Certaines espèces de sphingolipides présentent la même répartition que dans les fractions de foie. C'est le cas de la SM et de la sphingosine. La SM est majoritairement présente au niveau des MAM. Le niveau de SM est élevé au niveau de la fraction FM mais fortement diminué dans la fraction de MP, ce qui confirme sa présence dans les MAM. La sphingosine est majoritairement présente au niveau des mitochondries (FM et MP).

D'autres espèces ont une répartition différente dans les fractions de U251. Le céramide est présent au niveau des MAM et du RE mais également au niveau des fractions FM et MP. La sphinganine est très majoritairement présente au niveau des fractions mitochondriales (FM et MP). Le glucosyl céramide est présent au niveau des mitochondries, des MAM et du RE, alors que le lactosyl céramide est majoritairement présent au niveau des MAM.

Ces données permettent pour la première fois d'établir et de comparer les profils sphingolipidiques « quasi complets » des mitochondries, des MAM et du RE. Les MAM présentent une composition en marqueurs protéiques et en sphingolipides différentes des mitochondries et du RE. Nous avons également pu constater des différences de composition sphingolipidique entre les fractions subcellulaires de foies (souris) et de lignée cellulaire de glioblastome (U251). Ces différences peuvent être dues à plusieurs facteurs : espèces (souris et humain), tissus (foie et cerveau), niveau de prolifération (tissus sain et lignée cellulaire en culture).

Les travaux réalisés dans cette première partie font l'objet d'un article en cours d'écriture abordant l'aspect technique (fractionnement et UPLC-MS) et la recherche de marqueurs ou de profils lipidiques spécifiques des MAM.

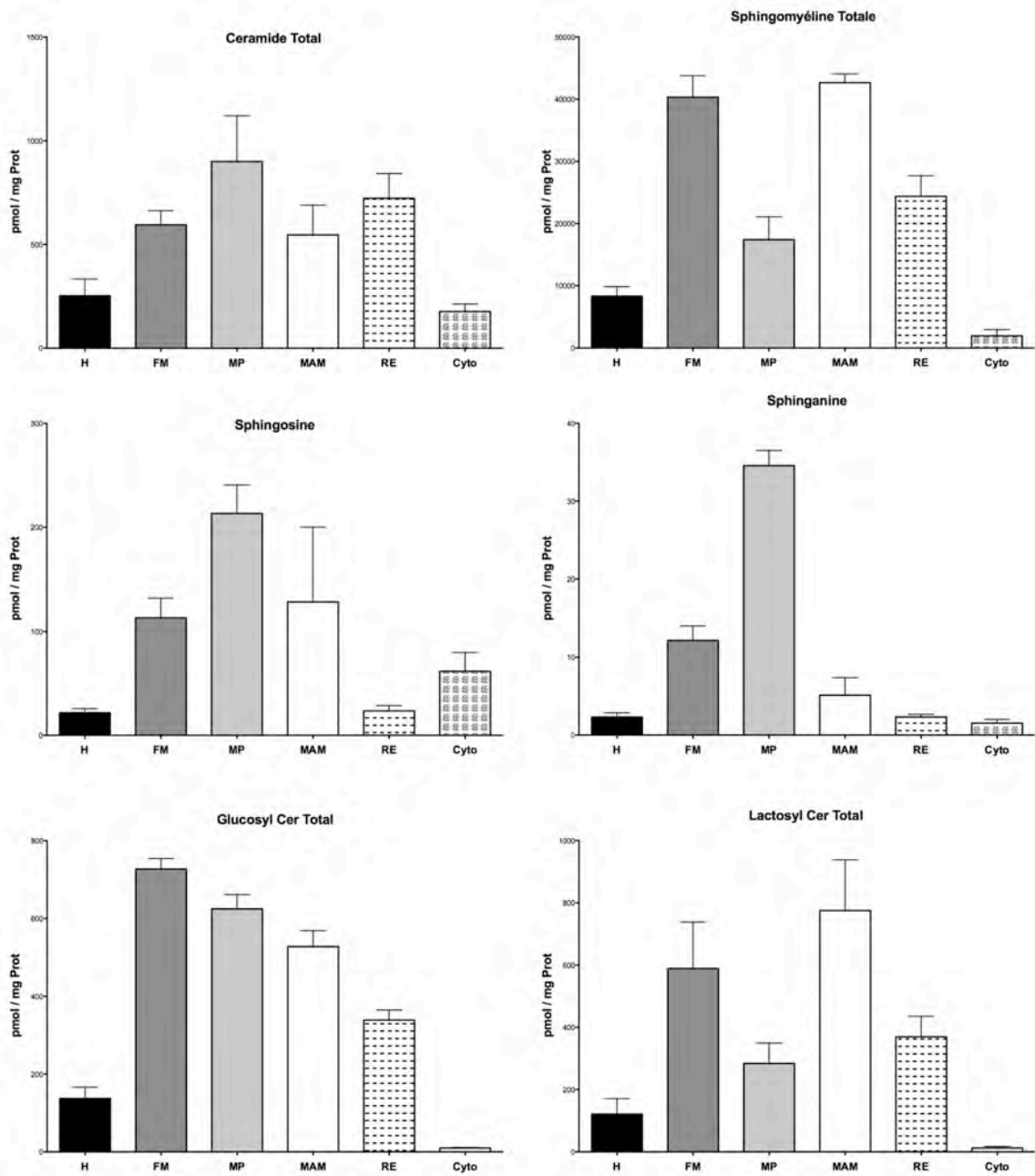


Figure 18 : Composition en sphingolipides des fractions de cellules U251. La composition en sphingolipides dans les fractions est analysée par UPLC-MS. Pour chaque fraction les lipides sont dosés dans 50 μ L de suspension. Les résultats sont ensuite exprimés en pmol de lipides par mg de protéines. (Moyenne \pm S.E.M, n=3)

6.2 Modification des MAM au cours de l'apoptose

6.2.1 Induction de l'apoptose dans les U251

Pour la suite de nos travaux nous nous sommes intéressé au rôle des MAM lors de l'induction et du déroulement de l'apoptose. L'objectif étant dans un premier temps de pouvoir étudier les variations de composition des MAM au cours de l'apoptose. Nous avons choisi pour cela de traiter les cellules U251 avec de la staurosporine, un inhibiteur non spécifique des kinases. Ce traitement est largement utilisé pour induire rapidement l'apoptose *via* l'activation des caspases, le clivage de Bid et le relargage de cytochrome c (Tang et al., 2000).

Dans notre modèle, la staurosporine déclenche une apoptose rapide. L'activation des caspases est détectable 2 heures après le début du traitement, puis atteint un maximum d'activité entre 4 et 6 heures avant de diminuer à partir de 8 heures (Figure 19 A).

L'entrée en apoptose s'accompagne d'une perturbation rapide du réseau mitochondrial visible dès 30 minutes (Figure 19 B). Après 2 heures de traitement, on observe une fragmentation très importante du réseau mitochondrial, une condensation du cytosol ainsi qu'une condensation et une fragmentation des noyaux.

Il est intéressant de noter que seules les mitochondries fonctionnelles (ayant conservé leur potentiel membranaire) sont visibles ici. Il est donc possible d'affirmer que le traitement à la staurosporine entraîne une activation rapide des caspases ainsi qu'une forte perturbation du réseau mitochondrial, mais que les mitochondries sont toujours fonctionnelles après 2 heures de traitement et malgré l'activation des caspases.

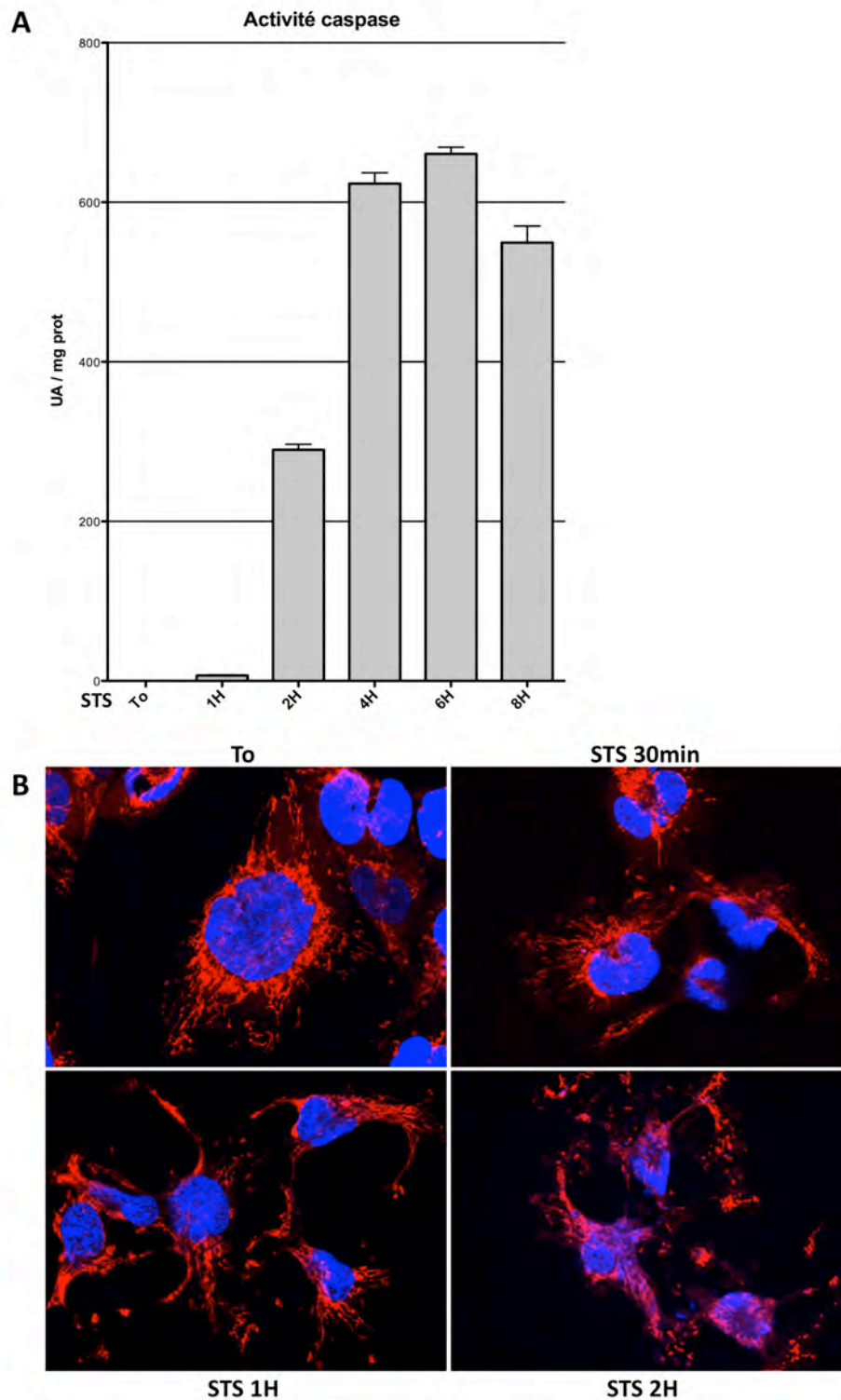


Figure 19 : Cinétique d'induction de l'apoptose dans les U251 par traitement à la staurosporine (STS). Les cellules U251 sont traitées à la staurosporine (0,5 µg/mL). (A) Mesure de l'activité caspase dans les lysats protéiques, exprimée en unité arbitraire (UA) par mg de protéine (Moyenne ± S.E.M, n=3). (B) Marquage du réseau mitochondrial au *Mito Tacker* (rouge) et des noyaux au dapi (bleu) (Images représentatives)

Nous avons ensuite vérifié l'impact de l'apoptose sur le niveau d'expression des protéines de la famille Bcl-2 et des marqueurs protéiques de fractions. On observe une légère diminution de l'expression de Bcl-2 et une disparition complète de Mcl-1 après 4 heures de traitement. L'expression de Bax diminue légèrement après 8 heures alors que le traitement n'a pas d'effet sur l'expression de Bak et Bcl-xL (Figure 20). Comme attendu, la staurosporine induit le clivage de Bid (diminution de la forme totale à 20 kDa et apparition de la forme clivée tBid à 15 kDa) à partir de 2 heures de traitement. En ce qui concerne l'expression des protéines utilisées comme marqueurs des fractions subcellulaires, on constate que la staurosporine entraîne une diminution importante du niveau d'expression de TOM20 après 4 heures de traitement. Cette diminution suggère un début de dégradation des mitochondries (Figure 20).

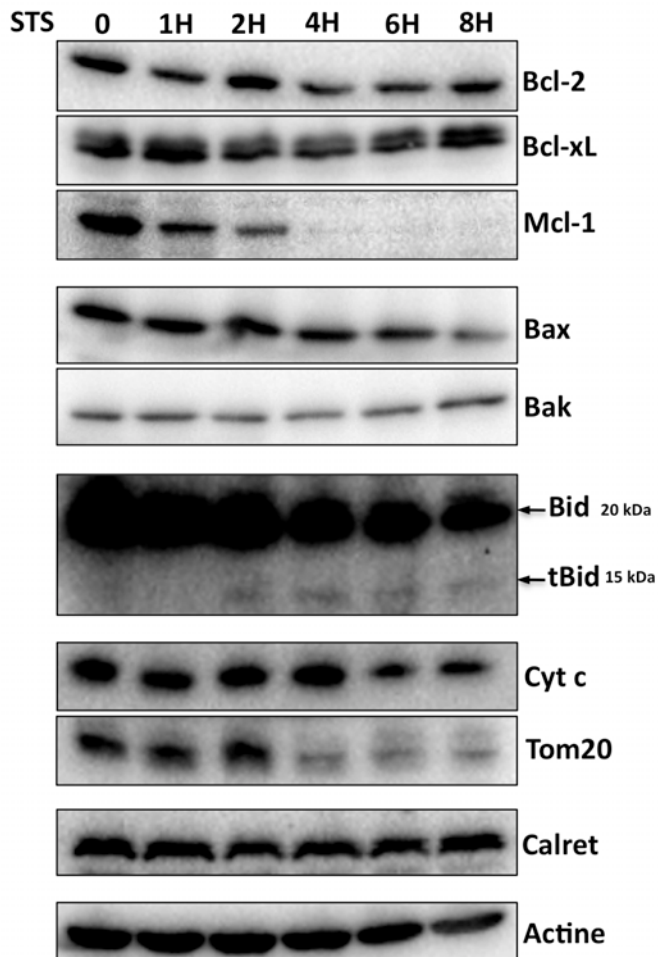


Figure 20 : Induction de l'apoptose dans les U251 par traitement à la staurosporine. Après traitement à la staurosporine (0,5 µg/mL), les cellules sont trypsinées, lavées au PBS et lysées en tampon RIPA. Les lysats protéiques sont déposés (30 µg de protéines) sur gel SDS-PAGE. Les niveaux d'expression des protéines de la famille Bcl-2 et des protéines utilisées comme marqueurs des fractions subcellulaires sont analysés par WB. (Résultats représentatifs d'au moins 3 expériences indépendantes)

L'induction de l'apoptose par la staurosporine induit également des modifications de la composition en sphingolipides des cellules. On observe à partir de 2 heures de traitement une diminution de la sphingosine et de la sphingomyéline (Figure 21). Ces diminutions, dans un contexte apoptotique, sont généralement associées à la génération de céramide, respectivement par la voie de synthèse *de novo* et par hydrolyse de la sphingomyéline. On observe effectivement une légère augmentation du niveau de céramide après 4 heures de traitement. Cette tendance à l'augmentation du céramide (céramide total, c'est à dire addition de toutes les longueurs de chaînes) est reproductible mais statistiquement non significative dans notre modèle (Figure 21). Par contre, le traitement induit une génération significative de céramide C16 à partir de 4 heures (Figure 22). Enfin, l'induction de l'apoptose par la staurosporine n'entraîne pas de perturbation significative des niveaux de sphinganine et des formes glycosylées du céramide (Figure 21).

En résumé, ces résultats montrent que notre modèle d'induction de l'apoptose par la staurosporine entraîne une perturbation rapide du réseau mitochondriale dès 30 minutes. A partir de 2 heures l'activité caspase est détectable dans les cellules, on observe alors une fragmentation importante des mitochondries, une condensation du cytosol, le clivage de Bid et une diminution des niveaux de sphingosine et de sphingomyéline. A partir de 4 heures, l'activité caspase est maximale, les niveaux d'expression de Bcl-2 et Tom20 sont diminués et Mcl-1 n'est plus exprimé. On constate également une augmentation du niveau de céramide.

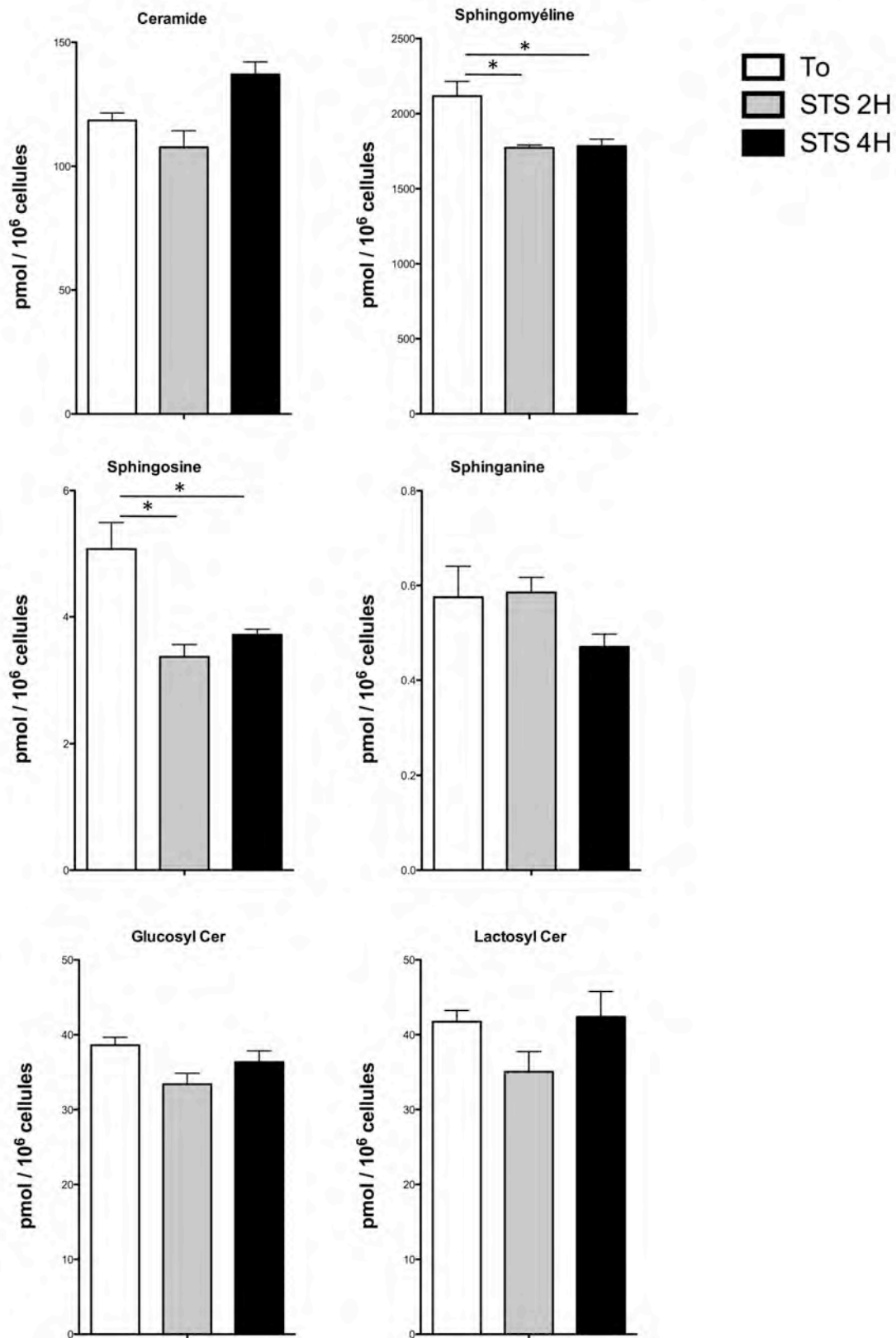


Figure 21 : Effet de l'induction de l'apoptose sur les niveaux de sphingolipides dans les U251. Après traitement à la staurosporine (0,5 µg/mL) les cellules sont trypsinées et lavées au PBS. On réalise ensuite l'extraction, la purification et le dosage des lipides. Les résultats sont exprimés en pmol de lipides par million de cellules.

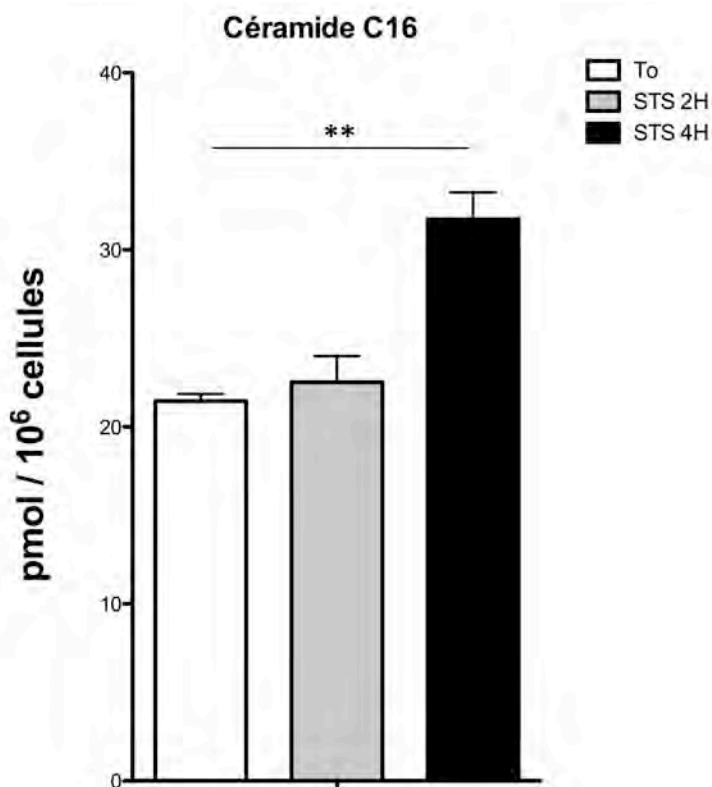


Figure 22 : Effet de l'induction de l'apoptose sur le niveau de céramide C16 dans les U251. Les résultats sont exprimés en pmol de lipides par million de cellules (Moyenne \pm S.E.M, n=3)

6.2.2 Modifications des profils sphingolipidiques des fractions subcellulaires au cours de l'apoptose

Nous avons ensuite étudié l'impact de l'induction de l'apoptose sur les profils sphingolipidiques des fractions subcellulaires. Le but étant de déterminer dans quelles fractions subcellulaires ont lieu les modifications des niveaux de sphingolipides observées dans les cellules (Figure 21). Le traitement à la staurosporine induit une élévation importante du niveau de céramide dans les fractions mitochondriales FM et MP. On observe dans le même temps une diminution du taux de sphingomyéline dans les fractions FM et MAM mais pas dans la fraction MP, ce qui montre que la diminution de sphingomyéline a lieu spécifiquement dans les MAM (Figure 23). Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus sur cellules entières (Figures 21 et 22). Ces données suggèrent alors que l'augmentation du taux de céramide observée au niveau des

mitochondries pourrait avoir pour origine une hydrolyse de la sphingomyéline au niveau des MAM.

Le reste des résultats sur les fractions paraît au premier abord moins cohérent avec les résultats obtenus sur cellules entières. Nous observons une diminution de la sphingosine dans les cellules en réponse au traitement à la staurosporine (Figure 21) laissant également envisager l'hypothèse d'une synthèse *de novo* de céramide. Cependant, on ne retrouve pas de diminution significative de la sphingosine (mais une simple tendance à la diminution) dans les fractions après induction de l'apoptose (Figure 24).

En ce qui concerne la sphinganine, le traitement entraîne une diminution dans les cellules entières mais on observe une augmentation du taux de sphinganine dans les fractions mitochondriales FM et MP.

Il est important de préciser que ces résultats sur cellules entières et sur fractions ne sont pourtant pas totalement incompatibles. Les fractions subcellulaires ne représentent qu'une petite portion de la cellule. L'augmentation du niveau de sphinganine dans certaines fractions mais pas au niveau de la cellule entière permet d'envisager un trafic intracellulaire de la sphinganine indépendamment de son niveau de synthèse. De plus, certaines fractions subcellulaires (noyaux et membranes plasmiques) ne sont pas récupérées. La diminution du niveau de sphingosine observée dans les cellules et pas dans les fractions pourrait donc avoir lieu au niveau de la membrane plasmique par exemple.

En ce qui concerne les formes glycosylées du céramide, l'induction de l'apoptose ne semble pas avoir d'effet significatif sur leur taux ni dans les cellules entières (Figure 21) ni dans les fractions subcellulaires (Figure 25).

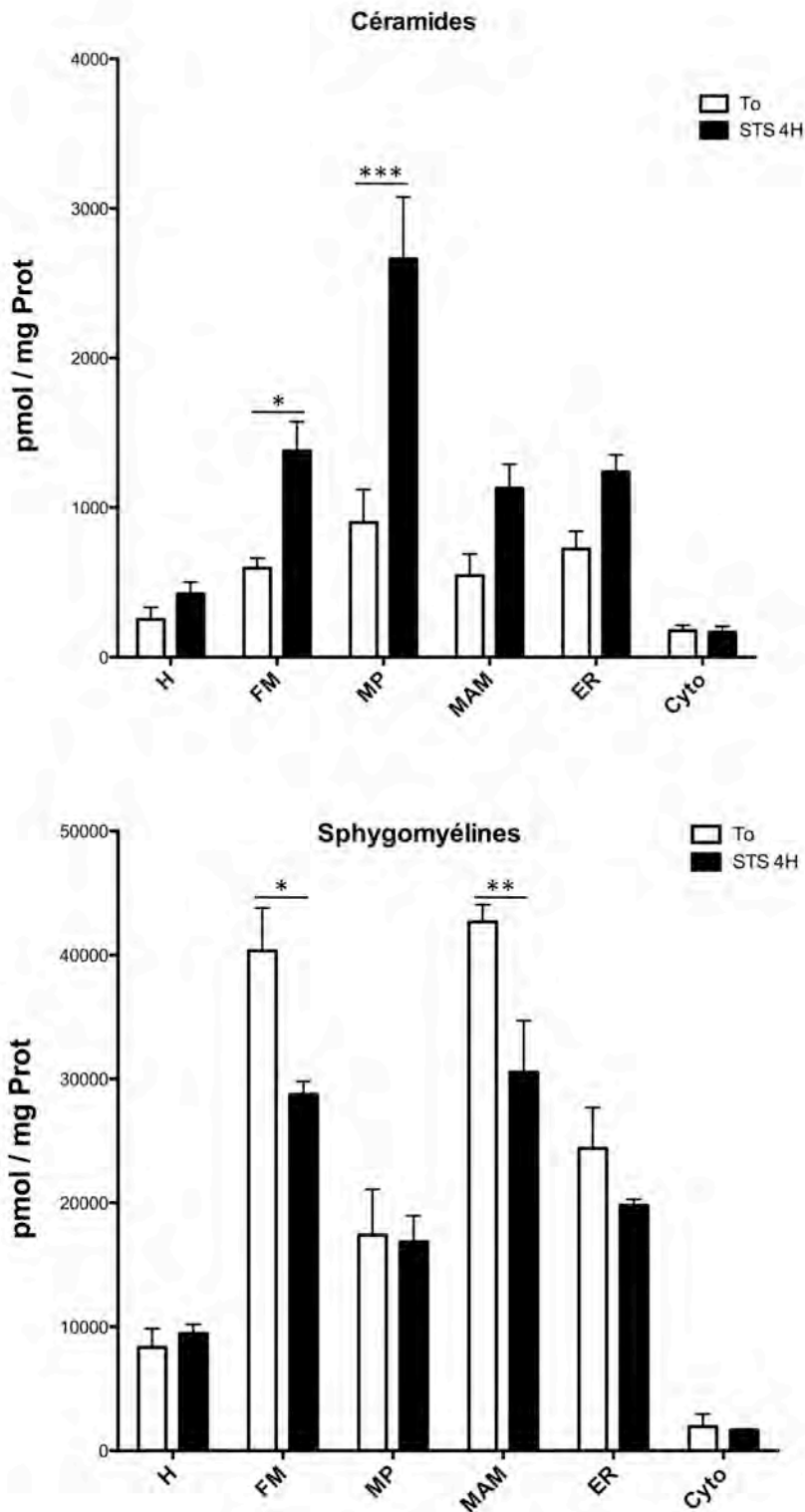


Figure 23 : Effet de l'apoptose sur les taux de céramide et de sphingomyéline dans les fractions subcellulaires. Après traitement à la staurosporine les cellules sont trypsinées et lavées au PBS. On réalise ensuite un fractionnement subcellulaire et le dosage des sphingolipides dans ces fractions. Les résultats sont exprimés en pmol de lipides par mg de protéine (Moyenne \pm S.E.M, n=3, p<0,05)

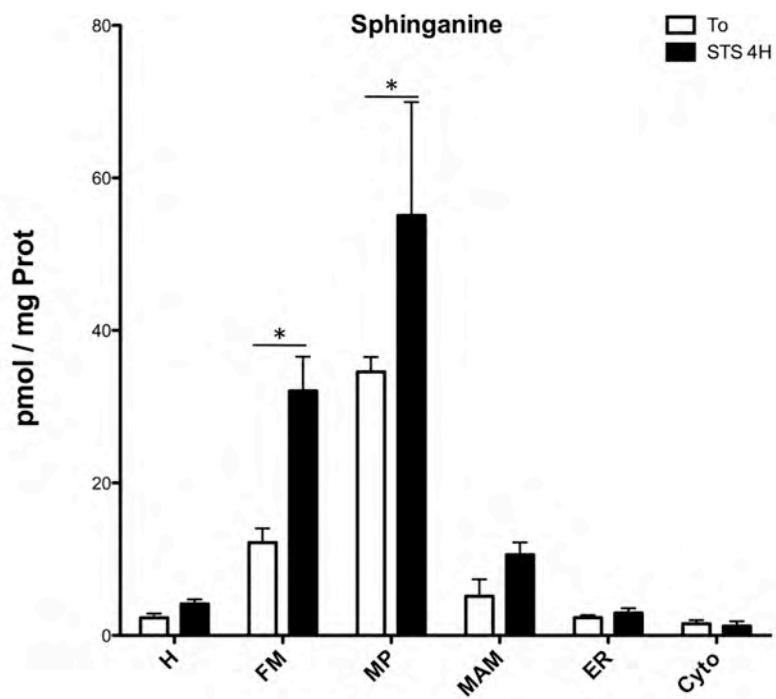
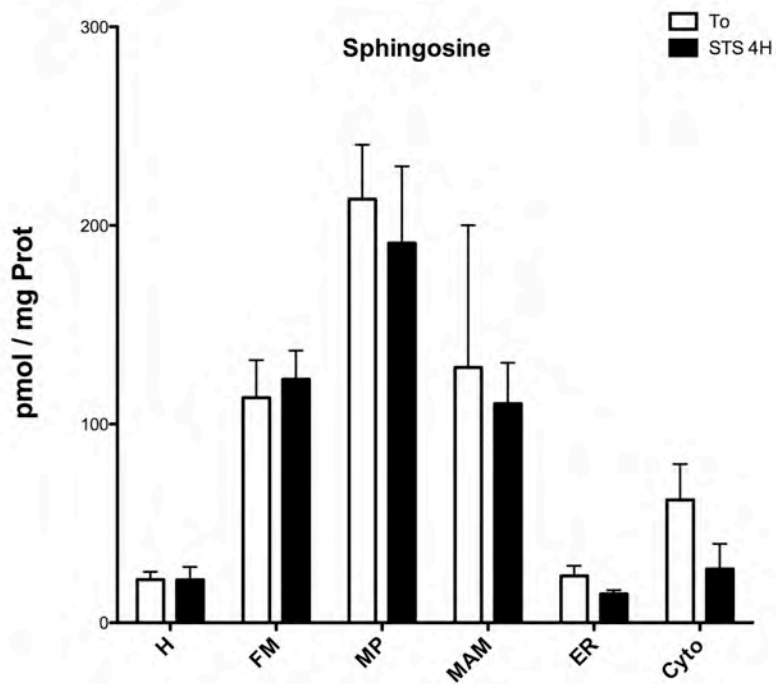


Figure 24 : Effet de l'apoptose sur les taux de sphingosine et de sphinganine dans les fractions subcellulaires. Les résultats sont exprimés en pmol de lipides par mg de protéine (Moyenne \pm S.E.M, n=3, p<0,05)

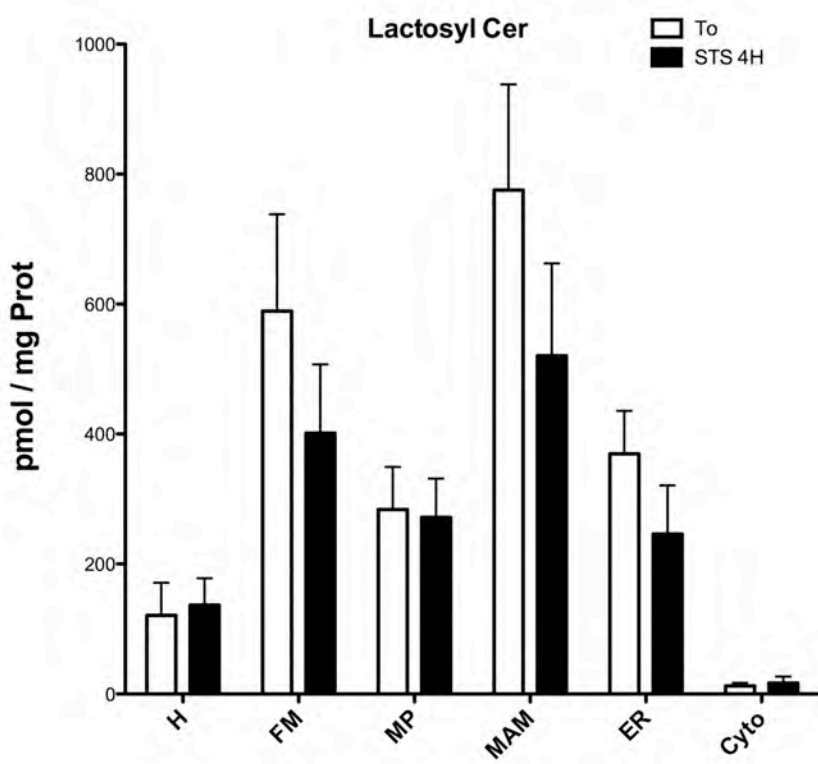
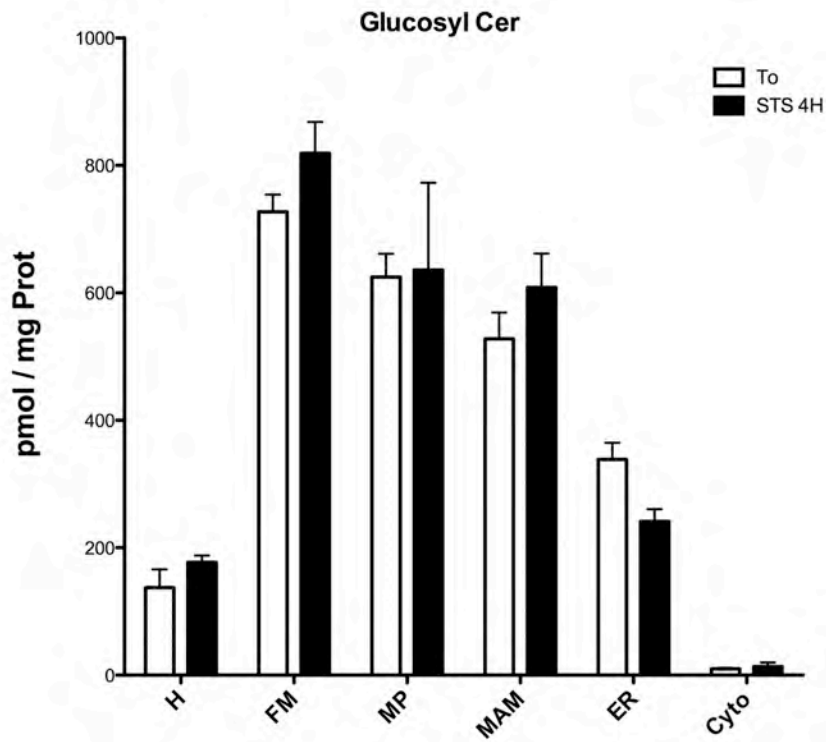


Figure 25 : Effet de l'apoptose sur les taux de glucosyl et lactosyl céramide dans les fractions subcellulaires. Les résultats sont exprimés en pmol de lipides par mg de protéine (Moyenne \pm S.E.M, n=3)

6.2.3 Redistribution des protéines de la famille Bcl-2 au cours de l'apoptose

Nous avons ensuite vérifié si ces modifications des profils lipidiques des fractions subcellulaires s'accompagnaient d'une relocalisation des protéines de la famille Bcl-2.

La translocation de Bax au niveau de la membrane mitochondriale externe au cours de l'apoptose est un phénomène très largement décrit. On constate que dans notre modèle, l'induction de l'apoptose entraîne une relocalisation de Bax au niveau de la fraction MP mais également au niveau des MAM (Figure 26). Une quantité importante de Bax est également située dans le RE et le cytosol mais n'évolue pas au cours de l'apoptose.

Bak est localisé au niveau des mitochondries (FM et MP) et semble subir une légère dégradation au cours de l'apoptose. Bid est présent au niveau des fractions mitochondriale, du RE et du cytosol. On observe une diminution de sa forme totale (20 kDa) dans toutes ces fractions. Cette diminution est très probablement associée à son clivage (Tang et al., 2000) bien que la forme clivée (15 kDa) ne puisse pas être mise en évidence ici (Figure 26).

En ce qui concerne les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, on remarque que la protéine Mcl-1 est exclusivement localisée au niveau des mitochondries et rapidement dégradée au cours de l'apoptose. La protéine Bcl-xL est localisée au niveau des mitochondries, du cytosol et dans une moindre mesure des MAM et du RE. Au cours de l'apoptose, Bcl-xL semble subir une légère relocalisation au niveau des fractions MP et MAM.

Le résultat le plus inattendu concerne la protéine Bcl-2. A l'état basal, Bcl-2 est présent dans la fraction FM, le RE et en plus faible quantité au niveau des MAM, mais Bcl-2 n'est pas détectable dans la fraction MP. L'induction de l'apoptose entraîne une relocalisation massive de Bcl-2 au niveau des MAM et plus légèrement au niveau de la fraction MP.

L'ensemble de ces résultats montre qu'au cours de l'apoptose, des modifications des profils lipidiques des fractions et une redistribution des protéines de la famille Bcl-2 au sein de ces fractions ont lieu simultanément. Au vu des données bibliographique, on peut suggérer une possible interaction entre ces deux phénomènes.

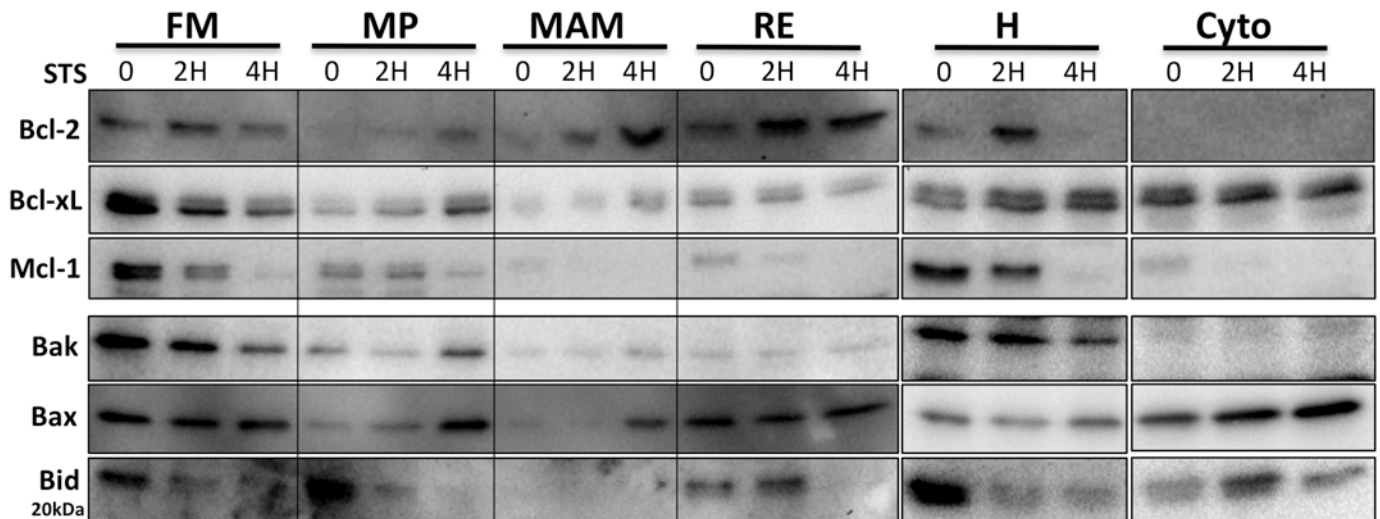


Figure 26 : Effet de l'induction de l'apoptose sur la redistribution des protéines de la familles Bcl-2 dans les fractions subcellulaires. Après traitement à la staurosporine les cellules sont trypsinées et lavées au PBS. On réalise ensuite un fractionnement subcellulaire puis l'analyse de la composition des fractions par western blot (Résultats représentatifs d'au moins 3 expériences indépendantes)

6.2.4 Modifications des interactions protéiques au cours de l'apoptose

La redistribution des protéines dans les fractions subcellulaires au cours de l'apoptose peut être induites par différents mécanismes. Dans notre principale hypothèse de travail nous proposons que cette redistribution soit directement liée aux modifications de la composition lipidique des fractions subcellulaires. Cependant, nous avons tout de même examiné les différentes interactions protéiques qui pourraient évoluer au cours de l'induction de l'apoptose et expliquer la redistribution des protéines de la famille Bcl-2. Nous avons pour cela réalisé des tests de PLA (*proximity ligation assay*). Cette technique permet de réaliser une mesure quantitative des interactions entre deux protéines. Nous nous sommes intéressé plus particulièrement à la protéine Bcl-2, relocalisée au niveau des MAM et de la mitochondrie. Nous avons donc choisi de mesurer les interactions entre Bcl-2 et un marqueur mitochondriale (Tom20), un marqueur des MAM (IP3R) et Bax.

On constate que l'induction de l'apoptose entraîne une légère augmentation (reproductible mais non significative) des interactions entre Bcl-2 et Bax (Figure 27). Elle entraîne également une forte augmentation des interactions entre Bcl-2 et Tom20

après 2 heures et 4 heures de traitement (Figure 27). Par contre, la mesure des interactions entre Bcl-2 et IP3R est toujours en cours de mise au point.

On précise qu'il s'agit ici de résultats préliminaires (triplicats techniques, n=1)

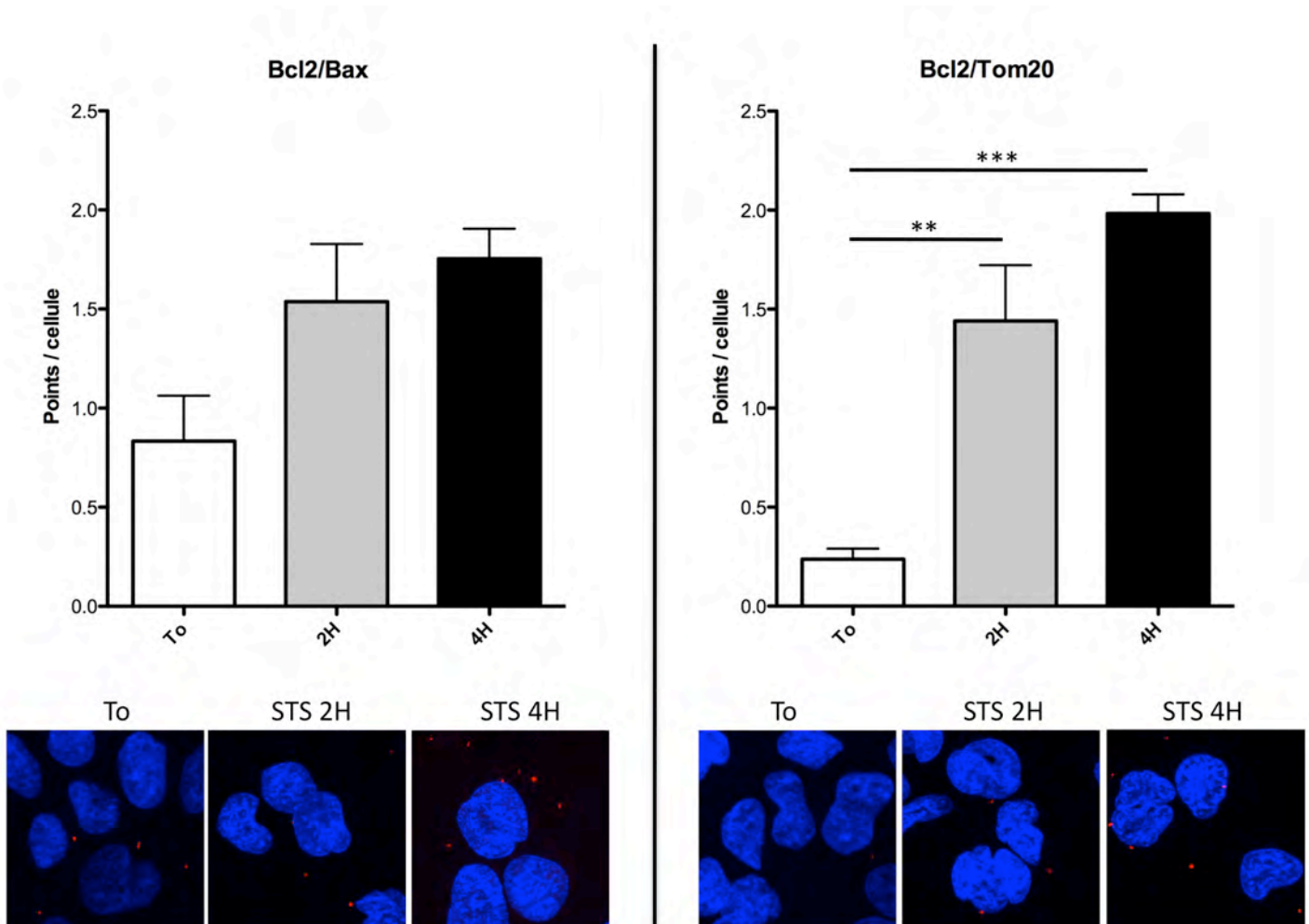


Figure 27 : Evolution des interactions protéiques au cours de l'apoptose.

Les cellules U251 sont cultivées sur lamelles de verre. Après traitement à la staurosporine les cellules sont fixées puis perméabilisées. Les interactions entre Bcl-2 et une autre protéine d'intérêt sont alors mesurées par PLA. Chaque point rouge représente une interaction (proximité inférieure à 30 nm) entre les deux protéines. Les noyaux sont marqués au Dapi (bleu). Les résultats sont exprimés en nombre de points par cellules (Moyenne \pm S.E.M, n=3, p<0,01)

6.3 Rôle de Bax et Bak dans la synthèse des sphingolipides

Des travaux réalisés au laboratoire ont permis de montrer qu'une autre catégorie de lipides bioactifs participe au contrôle de l'activité de Bax, les prostaglandines (Lalier et al., 2007b, 2011a, 2011b). La PGE2 intracellulaire est capable d'induire l'activation de Bax et l'apoptose. La suite de ces travaux indiquait que le taux de PGE2 est augmenté dans les cellules dont l'expression de Bax est invalidée suggérant un rétrocontrôle de Bax sur la synthèse de PGE2 (Figure 28).

De très nombreux travaux montrent que les sphingolipides et en particulier le céramide sont impliqués dans l'apoptose et l'activité de Bax. Nous avons donc étudié le rôle potentiel de Bax sur la synthèse des sphingolipides (Figure 28).

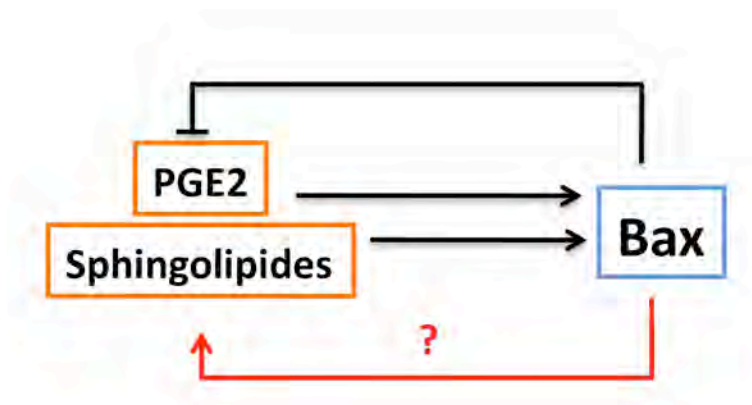


Figure 28 : Schéma du rôle potentiel de Bax dans la synthèse des sphingolipides.

Des travaux réalisés au laboratoire ont montré que PGE2 est capable d'induire l'activation de Bax et que Bax exerce un rétrocontrôle sur le niveau de PGE2. Certains sphingolipides étant impliqués dans l'apoptose et l'activation de Bax nous avons recherché dans quelle mesure Bax (et Bak) pouvaient être impliqués dans la régulation de la synthèse des sphingolipides.

Pour tester le rôle de Bax et Bak dans la synthèse des sphingolipides nous avons invalidé leurs expressions par shRNA dans la lignée cellulaire U251. On constate que les shBax et shBak entraînent bien respectivement une diminution importante de l'expression de Bax et Bak. Un shScr (*scramble*) non spécifique est utilisé comme contrôle (Figure 29 A). Les taux de sphingolipides sont alors mesurés par spectrométrie de masse dans ces cellules. On constate que les invalidations de Bax ou Bak n'ont pas d'effet significatif sur le taux de sphingomyéline (Figure 29 B). Par contre on observe une diminution significative du niveau de céramide C16 et C24:1 dans les cellules shBax. Cet effet est

encore plus important lors de l'invalidation de Bak (Figure 30 A). Les invalidations de Bax ou Bak entraînent également une diminution du niveau de S1P (C18 et C18:1) dans les cellules (Figure 30 B).

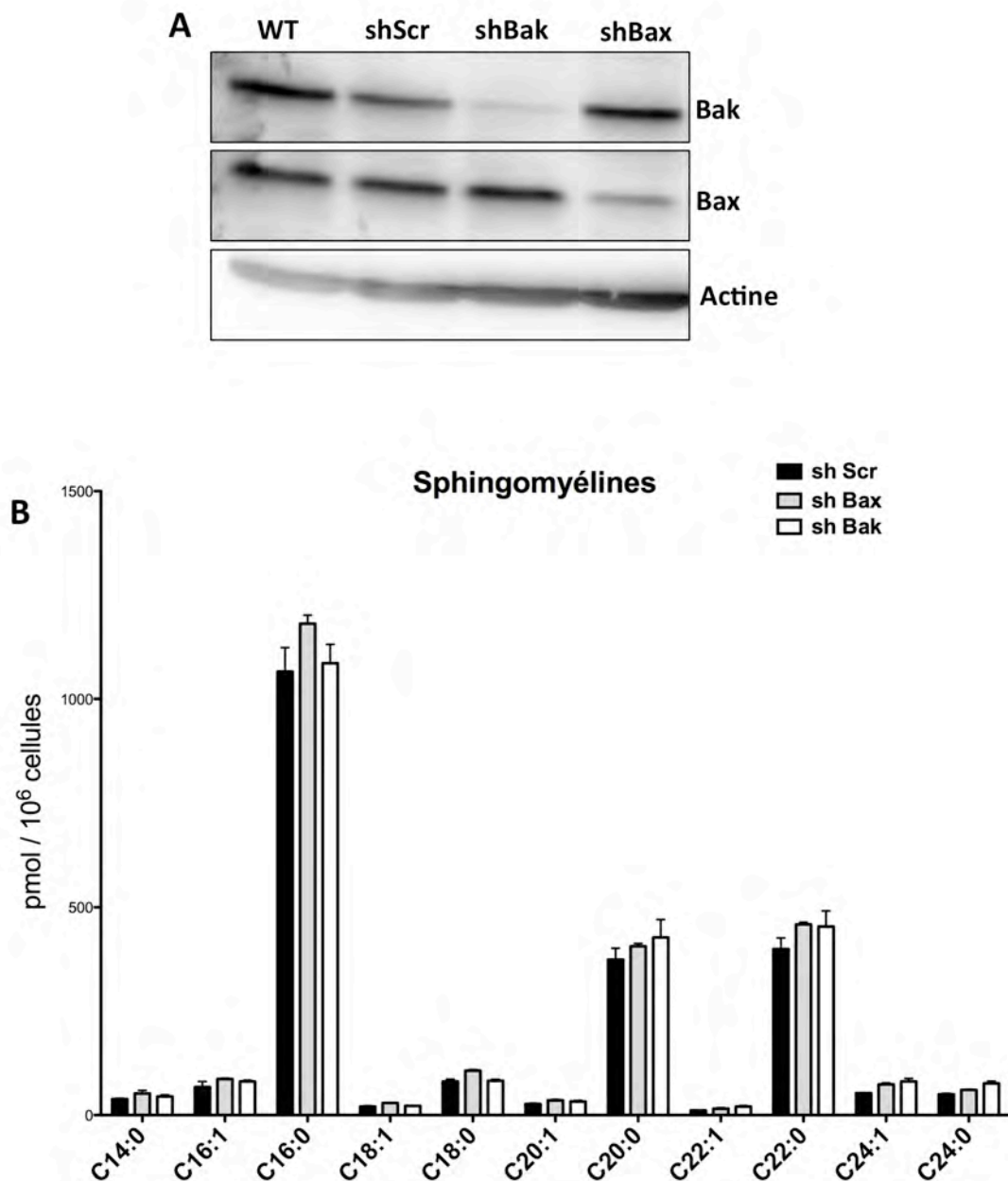


Figure 29 : Effet de l'invalidation de Bax et Bak sur le taux de sphingolipides dans les cellules U251
L'expression de Bax et Bak est invalidée par shRNA. (A) Les invalidations de l'expression de Bax et Bak sont contrôlées par western blot. Un shScr (*scramble*) est utilisé comme contrôle (Résultats représentatifs d'au moins 3 expériences indépendantes). (B) Dosage de la sphingomyéline dans les cellules par UPLC-MS. Les résultats sont exprimés en pmol par millions de cellules (Moyenne \pm S.E.M, n=3)

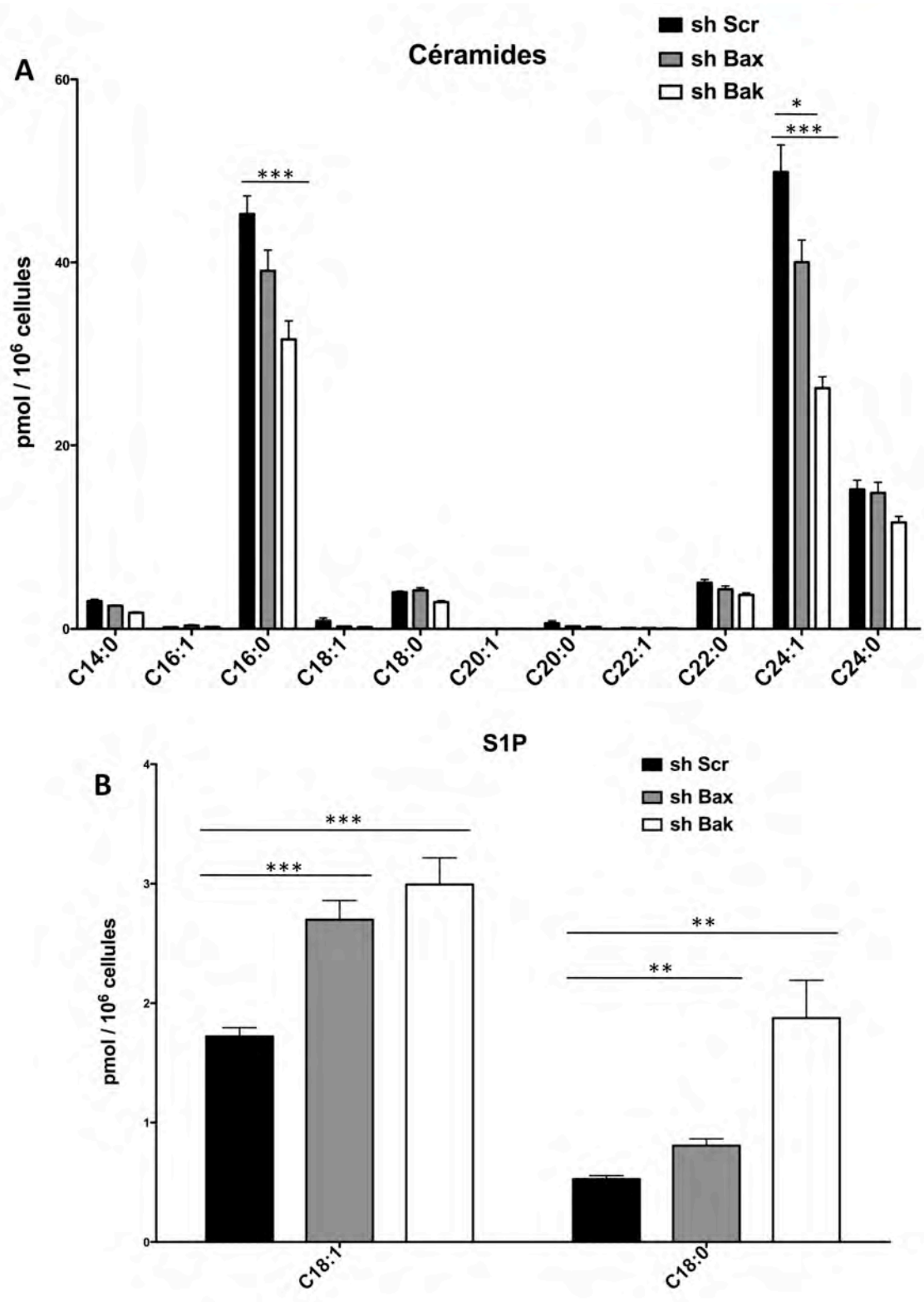


Figure 30 : Effet de l'inactivation de Bax et Bak sur le taux de sphingolipides dans les cellules U251
Après inactivation de l'expression de Bax ou de Bak par shRNA, les niveaux de céramides (A) et de S1P (B) sont mesurés dans les cellules par UPLC-MS. Les résultats sont exprimés en pmol par million de cellules (Moyenne \pm S.E.M, n=3, p<0,05)

Ces premières données montrent que l'invalidation de Bax et Bak entraîne une diminution du taux de céramide et une augmentation de la S1P dans les cellules U251. Nous avons alors vérifié si ces effets étaient observables dans une autre lignée cellulaire. Nous disposons pour cela au laboratoire d'une autre lignée cellulaire de glioblastome humain, les cellules U87, dont l'expression de Bax est invalidée par shRNA. On remarque que dans cette lignée l'expression de Bax est diminuée par le shBax71 mais pas par le shBax72. Le shScr et le shBax72 peuvent ainsi servir de contrôles (Figure 31 A).

Bien que la diminution de l'expression de Bax par shRNA soit ici moins importante que dans les U251, on observe les mêmes effets. L'invalidation partielle de l'expression de Bax par shRNA n'a pas d'effet significatif sur le taux de sphingomyélines (Figure 31 B) mais entraîne une diminution significative du niveau de céramide C16, C24 et C24:1 (Figure 32 A) et une augmentation du niveau de S1P (Figure 32 B).

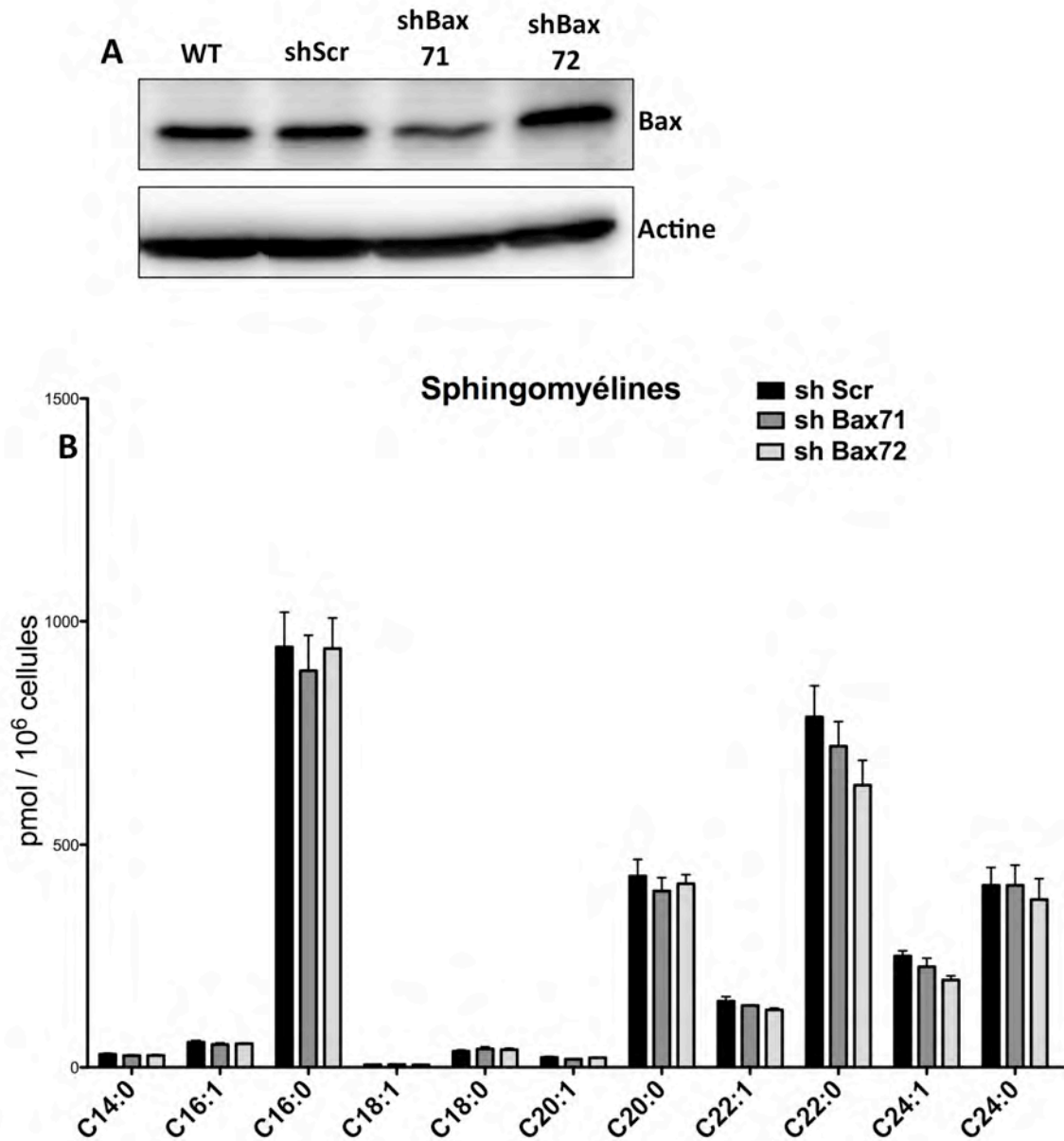


Figure 31 : Effet de l'inactivation de Bax sur le taux de sphingolipides dans les cellules U87
 L'expression de Bax est invalidée par shRNA. (A) L'inactivation de l'expression de Bax est contrôlée par western blot. Le shScr (non spécifique) et le shBax72 (n'ayant pas d'effet sur le niveau d'expression de Bax) sont utilisés comme contrôles (résultats représentatifs d'au moins 3 expériences indépendantes). (B) Dosage de la sphingomyéline dans les cellules par UPLC-MS. Les résultats sont exprimés en pmol par millions de cellules (Moyenne \pm S.E.M, n=3)

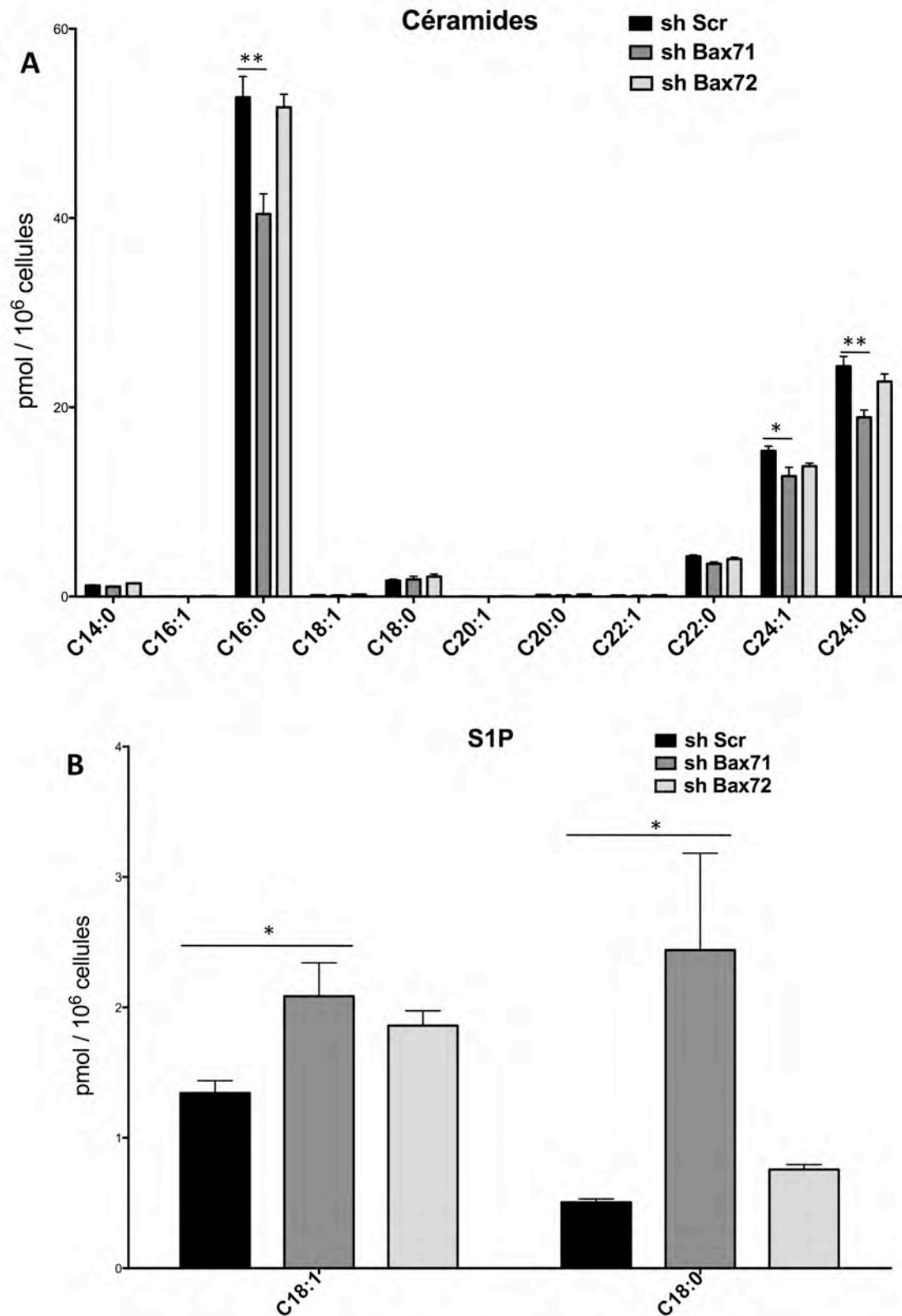


Figure 32 : Effet de l'inactivation de Bax sur le taux de sphingolipides dans les cellules 87
Après inactivation de l'expression de Bax par shRNA, les niveaux de céramides (A) et de S1P (B) sont mesurés dans les cellules par UPLC-MS. Les résultats sont exprimés en pmol par million de cellules (Moyenne \pm S.E.M, n=3, p<0,05)

Ces données montrent que l'invalidation de l'expression de Bax ou Bak entraîne une diminution du niveau de céramide et une augmentation du niveau de S1P dans deux lignées cellulaires de glioblastome. Ces modifications semblent caractéristiques d'une augmentation de la survie ou d'une diminution de l'apoptose, ce qui peut paraître particulièrement cohérent dans le cadre de l'invalidation de l'expression de protéines pro-apoptotiques. Nous avons donc voulu vérifier si ces effets étaient dus directement à l'expression des protéines Bax et Bak indépendamment de leur rôle dans l'apoptose ou à une modification de l'homéostasie cellulaire (balance survie / apoptose).

Pour tester ces deux hypothèses nous avons choisi de surexprimer la protéine Bcl-2 dans la lignée U251 (Figure 32 A). On constate alors que la surexpression de Bcl-2 n'a pas d'effet significatif sur les niveaux de sphingomyéline et de céramide.

L'ensemble de ces données suggère que Bax et Bak jouent un rôle direct et non redondant sur le niveau d'expression du céramide et de la S1P.

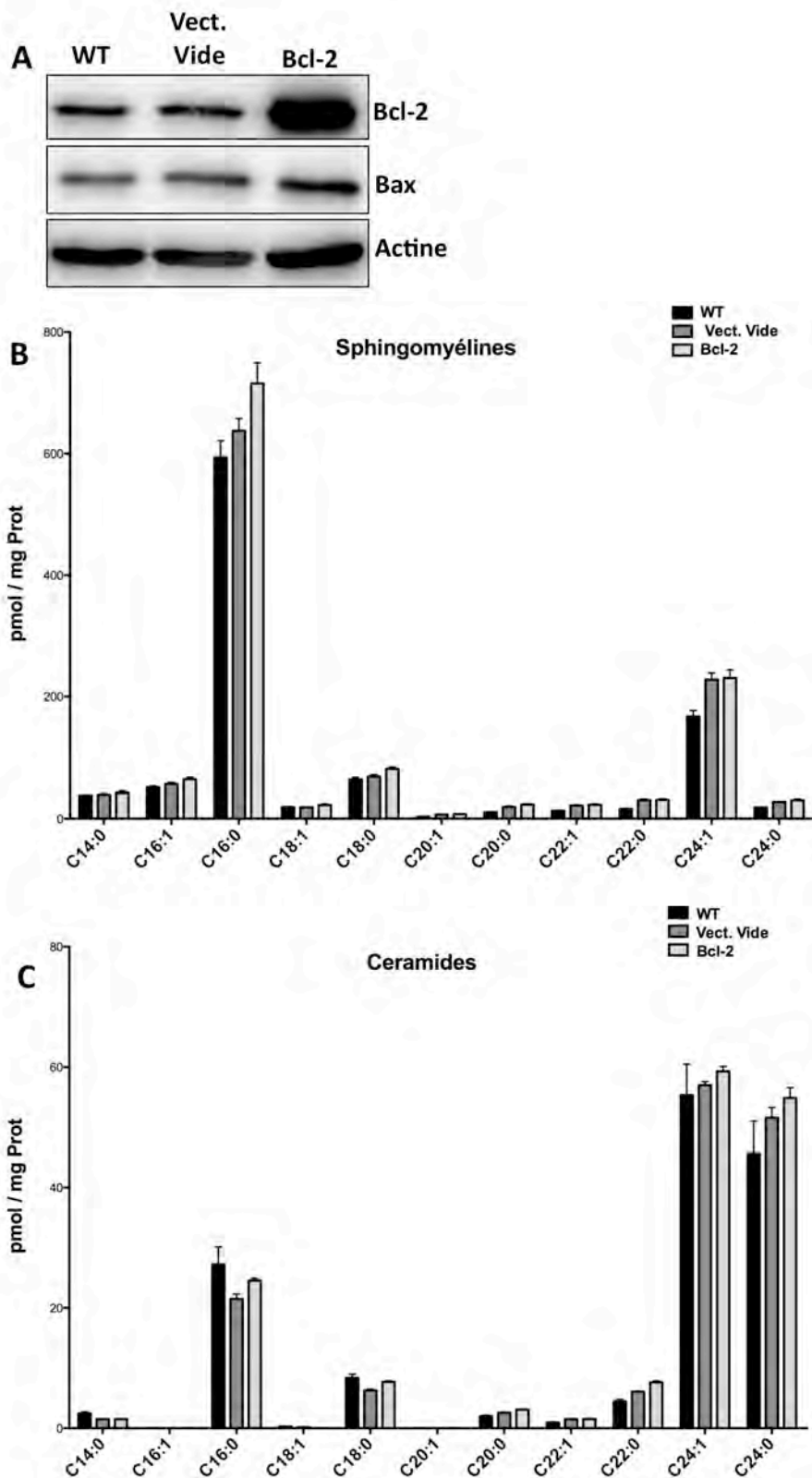


Figure 33 : Effet de la surexpression de Bcl-2 sur les niveaux de sphingolipides dans les U251.

La protéine Bcl-2 est surexprimée de façon stable dans les cellules U251 grâce à la transfection d'un vecteur d'expression plasmidique. (A) Le niveau d'expression de Bcl-2 est contrôlé dans les cellules par western blot plusieurs passages après transfection (résultats représentatifs d'au moins 3 expériences indépendantes). Les niveaux des sphingomyélines (B) et de céramide (C) sont ensuite dosés dans les cellules par UPLC-MS. Des cellules transfectées à l'aide d'un vecteur vide sont utilisées comme contrôle. Les résultats sont exprimés en pmol par million de cellules (Moyenne \pm S.E.M, n=3)

Quatrième Partie

Discussion et perspectives

7 Discussion et perspectives

L'objectif du projet était de mieux comprendre comment certains sphingolipides participent à l'activation de Bax et Bak au cours de l'apoptose. Ces sphingolipides étant majoritairement synthétisés au niveau du RE, nous avons orienté notre travail vers une étude des interactions entre le RE et la mitochondrie. Nous nous sommes particulièrement intéressé à l'évolution quantitative de ces interactions ainsi qu'aux variations de composition sphingolipidique des fractions de mitochondries, de MAM et de RE. Nous avons également cherché à caractériser la redistribution des protéines de la famille Bcl-2 au cours de l'apoptose.

7.1 Analyse de la composition des fractions

7.1.1 Distribution des marqueurs protéiques

Nos travaux ont permis de mettre au point une méthode de fractionnement subcellulaire par centrifugation différentielle, efficace sur des tissus murins (foie et SNC) et sur des lignées cellulaires en culture. L'analyse des marqueurs protéiques dans les fractions confirme que les mitochondries non purifiées contiennent des marqueurs du RE, ce qui témoigne de la présence des MAM. La purification de ces mitochondries permet de les séparer des MAM. Les mitochondries purifiées ne contiennent alors plus (ou très peu) de marqueurs de RE. D'autre part, les MAM ne contiennent pas de marqueurs mitochondriaux (cytochrome c et Tom20). L'analyse comparative de l'expression de ces différents marqueurs montre que les fractions présentent un niveau négligeable de contamination croisée.

Par contre, on retrouve tout de même une quantité importante de VDAC au niveau des MAM. Cette protéine participe à la liaison des MAM et des mitochondries *via* son interaction avec IP3R. On peut alors émettre l'hypothèse que VDAC soit indifféremment conservée du côté des MAM ou du côté des mitochondries au cours de la purification.

Ce phénomène pourrait avoir lieu avec d'autres protéines qui interagissent au sein d'un complexe à l'interface MAM-mitochondrie (comme par exemple les autres complexes impliqués dans la liaison des MAM et des mitochondries).

Cette notion est particulièrement importante pour l'analyse de la composition protéique des MAM et donc pour l'étude de la redistribution des protéines de la famille Bcl-2 dans les différentes fractions au cours de l'apoptose.

7.1.2 Profils sphingolipidiques

Cette méthode de fractionnement subcellulaire associée à une analyse par UPLC-MS nous a permis de caractériser avec précision les profils sphingolipidiques des fractions. Une première série d'observations intéressantes concerne les différences constatées entre les résultats obtenus dans les organes de souris et dans la ligné cellulaire U251.

7.1.2.1 Longueur de chaines des céramides

Ces différences se situent d'abord au niveau des longueurs de chaines exprimées dans ces différents types cellulaires et ne concernent pas en particulier les fractions subcellulaires mais les cellules entières. En ce qui concerne les céramides par exemple, les foies de souris et les cellules U251 contiennent majoritairement les longueurs de chaines C16, C18, C24 et C24:1 alors que les cerveaux de souris expriment très majoritairement du céramide C18 (données non présentées). Ces variations pourraient s'expliquer par l'expression de différentes céramide synthases (CerS) dans ces cellules. La génération de céramide par la voie de synthèse *de novo* a lieu dans le RE et est dépendante de l'activité des CerS. Il existe 6 CerS qui permettent chacune la synthèse de céramide de longueurs de chaines spécifiques. Nous n'avons pas comparé l'expression des différentes CerS dans nos cellules mais nos dosages de céramide sont en partie corrélés avec les données bibliographiques concernant l'expression des CerS. La CerS majoritaire dans le cerveau est en effet la CerS1 (très peu exprimée dans le foie) qui est justement associée à la synthèse du céramide C18 (Grösch et al., 2012).

La suite de notre étude nous a amené à nous intéresser plus particulièrement à la distribution des différentes classes de sphingolipides dans les fractions subcellulaires. On constate que les ratios des différentes longueurs de chaines observés au niveau des cellules entières sont conservés dans les fractions. L'analyse de chaque longueur de chaîne pour toutes les classes de sphingolipides est alors très redondante et ne semble donc pas nous apporter d'information supplémentaire (la constance des ratios est tout

de même contrôlé après chaque expérience). A partir de ces observations nous avons choisi de traiter la quasi totalité de nos dosages lipidiques par addition de toutes les longueurs de chaînes de chaque classe. Cette méthode nous a paru être la mieux adaptée pour notre projet mais on peut tout de même signaler que les différentes longueurs peuvent être associées à des effets biologiques différents.

7.1.2.2 Localisation du céramide

Une autre observation importante concerne la différence de répartition du céramide dans les fractions de foies de souris et de cellules U251. Dans les foies, le céramide est majoritairement présent au niveau des MAM et du RE. La purification des mitochondries entraîne d'ailleurs une diminution du niveau de céramide (comparaison FM et MP). Ces premiers résultats sont parfaitement cohérents avec les données disponibles dans la littérature montrant que la synthèse de céramide a majoritairement lieu au niveau du RE (potentiellement des MAM) et de la membrane plasmique (en cas de stress cellulaire par exemple) (Bartke and Hannun, 2009). Les résultats sont par contre totalement différents en ce qui concerne les fractions de cellules U251 où le céramide est majoritairement présent dans la fraction MP. Ce résultat n'était donc pas attendu mais au moins 2 hypothèses simples peuvent être émises. La première est qu'il pourrait exister une génération plus importante de céramide au niveau des mitochondries dans les cellules U251. Les mitochondries peuvent en effet contenir des CerS et donc générer du céramide (Bionda et al., 2004). Il serait intéressant de vérifier si les mitochondries des cellules en culture présentent une activité plus élevée des CerS. La seconde hypothèse repose sur le fait qu'il pourrait exister dans les cellules un transfert plus élevé du céramide depuis le RE vers les mitochondries *via* les MAM.

Il est intéressant de constater qu'il existe une autre différence au niveau des mitochondries de foies et de cellules U251 : la localisation de Bax à l'état basal. Dans les fractions de foies, Bax est uniquement présent au niveau du cytosol alors que dans les cellules U251, une quantité importante de Bax est en permanence associée aux mitochondries (Figure 34). Des travaux réalisés au laboratoire avaient déjà permis de montrer que dans les cellules cancéreuses, à l'état basal, une fraction de Bax est présente

à la mitochondrie. Cette fraction de Bax non activé est simplement associée à la membrane mitochondriale (mais pas insérée). Nous n'avons pas pu établir de lien direct entre les variations de composition lipidique et la présence de Bax à la mitochondrie de façon constitutive mais il a déjà été montré que le céramide facilite l'association de Bax à la membrane mitochondriale (Lee et al., 2011). Un autre lipide, le cholestérol, est également présent à de plus forte concentration dans les mitochondries des cellules cancéreuses et peut alors favoriser l'association de Bax à la mitochondrie (Feo et al., 1973; Mignard et al., 2014).

D'un point de vue fonctionnel, cette augmentation du céramide et du niveau d'adressage de Bax à la mitochondrie pourrait être relié au niveau de résistance à l'apoptose accru dans les cellules cancéreuses. On peut supposer que ces cellules plus résistantes à l'apoptose peuvent supporter des quantités mitochondriales de céramide et de Bax plus importantes.

On approche également de la notion de « *priming* » apoptotique (Sarosiek et al., 2013b). Une étude plus poussée du *priming* de nos cellules nécessiterait cependant d'étudier la répartition d'autres protéines de la famille Bcl-2 et notamment des protéines anti-apoptotiques et des BH3 *only*. Nos données laissent tout de même envisager que la répartition intracellulaire du céramide pourrait participer au *priming* apoptotique des cellules. La suite de nos travaux a également permis de montrer que le niveau d'expression de Bax et de Bak peut influencer le niveau de synthèse des sphingolipides.

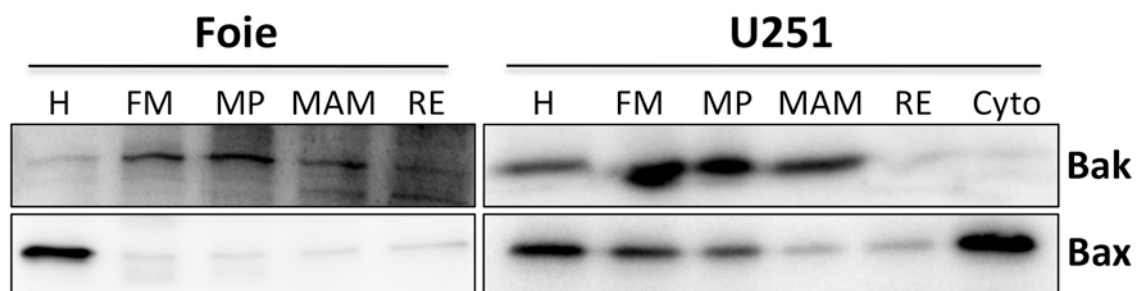


Figure 34 : Distribution de Bax et Bak dans les fractions subcellulaires de foies de souris et de cellules U251 à l'état basal. On constate que dans les fractions subcellulaires de foie de souris Bak est constitutivement présent au niveau de la mitochondrie et dans une moindre mesure des MAM alors que Bax n'est pas détectable dans ces fractions membranaires. Dans les fractions de cellules U251, on retrouve la même répartition de Bak. Bax est majoritairement présent au niveau du cytosol, comme on pouvait s'y attendre à l'état basal, mais une fraction de Bax est également présente au niveau des mitochondries. (Image représentative d'au moins 3 expériences indépendantes).

7.1.2.3 Formes glycosilées du céramide

Lors de l'analyse de la composition sphingolipidiques des fractions subcellulaires, nous avons pu déterminer que des formes glycosylées complexes du céramide (glucosyl et lactosyl céramide) sont présentes au niveau des mitochondries et des MAM. Les quantités de glucosylcéramide et lactosylcéramide que nous retrouvons dans les mitochondries de foies de souris sont très proches des valeurs déjà publiées dans la littérature, respectivement autour de 150 pmol et 40 pmol par mg de protéines (Ardail et al., 2001).

Les glycosilations du céramide ont majoritairement lieu au niveau de l'appareil de golgi et nécessitent donc le transport du céramide depuis le RE vers le golgi, puis la redistribution des formes glycosilées depuis le golgi vers les différents compartiments cellulaires. Bien que ces deux étapes de transport soient peu décrites, les données présentes dans la littérature montrent qu'elles peuvent avoir lieu par transport vésiculaire ou *via* des protéines de transport dont CERT et FAPP2 (Ichikawa and Hirabayashi, 1998; Yamaji et al., 2008). Il existe cependant une voie alternative pour fournir les mitochondries en glycosylcéramides. Une étude a effectivement montré que les MAM contiennent des activités glucosylcéramide et lactosylcéramide synthase importantes (Ardail et al., 2003).

De façon intéressante, on retrouve la présence de glucosyl et lactosyl céramide dans les mitochondries de cellules U251 mais à des concentrations beaucoup plus élevées que dans les foies, c'est à dire autour de 600 pmol par mg de protéines. Il semble alors important de comprendre si cette différence est due à une augmentation des activités glucosylcéramide et lactosylcéramide synthase spécifiquement dans les MAM ou à une augmentation des communications entre l'appareil de golgi et les mitochondries *via* les MAM. Une comparaison des activités glucosyltransférase et galactosyltransférase dans les fractions de foies et de cellules U251 semble alors intéressante pour comprendre ces différences.

L'analyse de la composition en gangliosides des fractions est également une piste de travail envisageable. En effet, le lactosylcéramide est ensuite un précurseur dans la

synthèse des gangliosides qui sont eux mêmes impliqués dans de nombreux processus cellulaires dont l'induction de l'apoptose (Giussani et al., 2014). De façon plus générale, l'ensemble des différences observées entre les fractions de cellules saines et de cellules cancéreuses peuvent être des pistes de travail intéressantes.

7.2 Variation de la composition des fractions au cours de l'apoptose

7.2.1 Variation de la composition lipidique

Les dosages de sphingolipides sur cellules entières ont montré que l'induction de l'apoptose par traitement à la staurosporine entraîne une augmentation du niveau céramide et une diminution de la sphingomyéline et de la sphingosine. Ces résultats sont cohérents avec les très nombreuses données présentes dans la littérature. De nombreux stress cellulaires peuvent induire la génération de céramide par activation de la voie de synthèse *de novo* (Chalfant et al., 2001; Liao et al., 1999; Perry et al., 2000) ou par hydrolyse de la sphingomyéline (Andrieu-Abadie and Levade, 2002). La voie de synthèse *de novo* implique l'activation des CerS qui transforment la sphinganine et la sphingosine en céramide. L'hydrolyse de la sphingomyéline est catalysée par les SMases. Les résultats obtenus sur cellules entières laissent, dans un premier temps, envisager l'implication de ces deux voies.

7.2.1.1 Hydrolyse de la sphingomyéline dans les MAM ?

Les dosages réalisés sur les fractions subcellulaires de cellules apoptotiques montrent que l'augmentation de céramide a lieu spécifiquement dans les mitochondries (fractions FM et MP). De plus, on retrouve une diminution du taux de sphingomyéline dans les fractions FM et MAM mais pas dans les mitochondries purifiées. Ces résultats laissent alors très fortement envisager qu'au cours de l'apoptose, une hydrolyse de la sphingomyéline a lieu spécifiquement dans les MAM et entraîne une augmentation du taux de céramide dans les mitochondries. L'hydrolyse de la sphingomyéline est majoritairement décrite au niveau de la face interne de la membrane plasmique sous l'action de l'aSMase (Andrieu-Abadie and Levade, 2002). Cependant, la présence de nSMase a récemment été décrite spécifiquement dans les MAM ce qui vient conforter notre hypothèse (Wu et al., 2010). De plus, une étude a montré qu'en réponse au TNF α ,

la génération de céramide au niveau de la mitochondrie par hydrolyse d'un pool mitochondrial de sphingomyéline permet l'activation de Bax et l'induction de l'apoptose (Birbes et al., 2005). Il est très intéressant de constater que dans cette étude les mitochondries analysées ne sont pas purifiées et sont donc encore associées aux MAM. Ces résultats obtenus sur un autre type cellulaire (MCF7) et en réponse à un inducteur de l'apoptose différent semblent confirmer l'importance de nos résultats.

L'étude dans notre modèle de la localisation de l'activité SMase et de ses variations au cours de l'apoptose pourrait permettre de valider définitivement notre hypothèse.

7.2.1.2 Autres variations lipidiques

A la vue de nos résultats, l'hypothèse d'une génération de céramide par la voie de synthèse de novo nous semble beaucoup moins probable. En effet, l'activation des CerS devrait théoriquement s'accompagner d'une diminution simultanée de la sphingosine et de la sphinganine. On observe bien une tendance à la diminution de la sphinganine mais non significative.

D'autre part, la diminution de sphingosine en réponse à la staurosporine dans les cellules entières n'est pas retrouvée dans les fractions subcellulaires ce qui affaiblit l'hypothèse de l'activation de la voie de synthèse *de novo* dans notre modèle. Encore une fois, l'étude des activités enzymatiques et de leur localisation pourrait répondre de façon plus précise à ces questions.

Il est également important d'analyser les différences observées entre les variations des profils sphingolipidiques des cellules entières et des fractions subcellulaires. Comme nous l'avons rappelé précédemment, plusieurs notions techniques doivent être prises en compte. Les fractions récupérées ne représentent qu'une très petite portion des cellules entières (autour de 20% en se basant sur les dosages de protéines). Les rendements obtenus sont différents selon les fractions. Enfin, toutes les fractions ne sont pas récupérées, les noyaux et les membranes plasmiques notamment.

Ainsi, la diminution de la sphingosine pourrait avoir lieu au niveau de la membrane plasmique par exemple, même si cela paraît peu probable. On observe une très légère tendance à la diminution dans certaine fraction et la reproductibilité des dosages de sphingosines semble légèrement moins bonne dans les fractions, comparée aux cellules

entières. Ces différentes observations ne permettent donc pas de conclure définitivement sur les variations du niveau de sphingosine dans les fractions au cours de l'apoptose.

Nous observons une augmentation importante du niveau de sphinganine dans les fractions mitochondriales, mais pas dans les cellules entières. Ces données laissent alors envisager une relocalisation de la sphinganine au cours de l'apoptose indépendamment de son niveau de synthèse, ce qui n'a jamais été décrit dans la littérature.

7.2.2 Redistribution des protéines de la famille Bcl-2

Après avoir étudié les profils sphingolipidiques nous nous sommes intéressés à la redistribution des protéines de la famille Bcl-2 au cours de l'apoptose. Certains résultats, déjà largement décrits dans la littérature, permettent dans un premier temps de valider notre modèle. On peut ainsi citer la présence constitutive de Bak au niveau de la membrane mitochondriale, de Bcl-xL dans le cytosol, l'absence de Bcl-2 au niveau du cytosol ou encore l'adressage de Bax et Bcl-xL à la mitochondrie au cours de l'apoptose (Lindsay et al., 2011).

D'autres résultats sont plus inattendus. Nous avons montré que l'entrée en apoptose induit l'adressage de Bax à la mitochondrie, mais également au niveau des MAM ce qui n'avait jamais été évoqué précédemment dans un contexte d'induction de l'apoptose.

Nous avons également montré que la protéine Bcl-2 est majoritairement localisée au niveau du RE et que l'induction de l'apoptose entraîne la relocalisation de Bcl-2 au niveau des MAM. D'un point de vue fonctionnel, des données de la littérature montrent que Bcl-2 peut interagir avec IP3R via son domaine BH4. Cette interaction entraîne l'inhibition de IP3R et du transfert de Ca^{2+} vers la mitochondrie et augmente la résistance à l'apoptose (Akl et al., 2014). La relocalisation de Bcl-2 au niveau des MAM que nous observons dans notre modèle pourrait donc être un mécanisme de résistance à l'apoptose. Il serait intéressant de vérifier si l'interaction Bcl-2/IP3R augmente en réponse à la staurosporine.

D'autre part, il a été montré que la forme phosphorylée inactive de Bcl-2 est majoritairement présente au niveau du RE (Bassik et al., 2004). Il pourrait donc être intéressant de vérifier dans notre modèle quel est l'état de phosphorylation de Bcl-2

présent au niveau des MAM et si le niveau de phosphorylation de Bcl-2 est modifié au cours de l'apoptose.

7.2.2.1 Localisation des protéines à l'interface MAM-mitochondrie ?

L'induction de l'apoptose entraîne donc, dans notre modèle, l'adressage de Bax, de Bcl-2 et dans une moindre mesure de Bcl-xL au niveau des MAM. Nous pouvons émettre deux hypothèses en ce qui concerne la localisation précise de ces protéines. Dans l'hypothèse la plus simple, ces protéines sont intégrées dans la membrane des MAM. Cependant, il est également possible qu'au cours de l'apoptose, ces protéines soient engagées dans des complexes à l'interface MAM-mitochondries. Lors de la purification des mitochondries, il est alors envisageable que les protéines engagées dans de tels complexes se retrouvent indifféremment dans la fraction MP ou dans la fraction MAM. Nous avons déjà évoqué cette possibilité concernant la présence de VDAC dans les MAM. Pour l'instant, nous ne pouvons donc pas déterminer avec précision si au cours de l'apoptose, Bax et Bcl-2 sont intégrés dans la membrane des MAM, impliqués dans des complexes protéiques ou interagissent ensemble à l'interface MAM-mitochondrie. Pour répondre à ces questions il serait possible de réaliser une analyse des complexes protéiques présents dans les fractions par électrophorèse en condition non dénaturante. Cette technique permettrait de vérifier si Bcl-2 et Bax sont engagés dans des complexes protéiques au niveau des MAM et si c'est le cas d'identifier leurs différents partenaires au sein de ces complexes. Il est également possible d'envisager une interaction directe de Bcl-2 et de Bax au niveau de l'interface MAM-mitochondrie. Nous avons montré grâce à la technique de PLA que les interactions Bcl-2/Bax augmentent lors de l'apoptose. Il semble possible de coupler cette technique à un co-marquage des MAM pour vérifier si cette interaction a lieu spécifiquement au niveau des MAM.

Les données de la littérature montrent que cette interaction entre Bcl-2 et Bax joue un rôle fonctionnel important au cours de l'apoptose. Il a en effet été montré que Bid et Bim sont capables d'activer Bcl-2 et d'induire son changement conformationnel. Bcl-2 ainsi activé peut interagir avec Bax et bloquer son oligomérisation dans la membrane mitochondriale entraînant un mécanisme de résistance à l'apoptose (Dlugosz et al., 2006). Nos données laissent alors suggérer que ce type d'interaction entre Bcl-2 et Bax pourrait avoir lieu au niveau des MAM.

7.2.2.2 Impact des modifications lipidiques

Notre travail a permis de caractériser des changements dans les profils sphingolipidiques des fractions subcellulaires ainsi que des redistributions des protéines de la famille Bcl-2 et de montrer que ces deux types de modifications ont lieu simultanément. En s'appuyant sur les données disponibles dans la littérature nous avons émis l'hypothèse que les modifications des profils lipidiques puissent être à l'origine de la redistribution des protéines de la famille Bcl-2. L'augmentation du taux mitochondrial de céramide peut par exemple favoriser l'adressage de Bax à la mitochondrie (Lee et al., 2011).

Il serait intéressant de vérifier si l'inhibition de la synthèse de céramide par la fumonisin B1 (inhibiteur des CerS) ou le GW4869 (inhibiteur de la nSMase) bloque la redistribution des protéines de la famille Bcl-2. L'intérêt de ces expériences est multiple. D'abord, comme nous venons de le dire, vérifier si les perturbations lipidiques sont à l'origine des redistributions protéiques. Ensuite étudier si la génération de céramide au niveau des mitochondries est due à une synthèse *de novo* ou comme nous le pensons à l'hydrolyse de la sphingomyéline au niveau des MAM. De plus, l'inhibition de la synthèse de céramide bloque l'entrée en apoptose dans différents modèles. Ces expériences pourraient alors déterminer dans quelle mesure les relocalisations de Bax et de Bcl-2 participent à l'entrée des cellules en apoptose.

7.2.2.3 Mécanisme d'adressage des protéines dans les fractions

Une de nos observations les plus importantes concerne la redistribution de Bcl-2 au cours de l'apoptose. Pour rappel, Bcl-2 est majoritairement présent dans le RE à l'état basal puis s'accumule dans les MAM et dans les mitochondries au cours de l'apoptose. De plus, Bcl-2 est absent du cytosol. Il semble alors probable que le pool de Bcl-2 qui s'accumule dans les MAM et les mitochondries au cours de l'apoptose provienne du RE. Nous disposons au laboratoire de constructions plasmidiques exprimant la protéine Bcl-2 à laquelle des séquences spécifiques d'adressage et de rétention au RE ou à la mitochondrie ont été ajoutés. La séquence d'adressage à la mitochondrie provient de la monoamine oxydase (Bcl-2-Moa) et la séquence d'adressage au RE provient du cytochrome b5 (Bcl-2-cb5). La comparaison de la répartition de Bcl-2-Moa et Bcl-2-cb5

dans nos fractions au cours de l'induction de l'apoptose pourrait permettre de mieux comprendre l'adressage de Bcl-2 au niveau des MAM. On peut supposer que les séquences de rétentions bloquent la redistribution de Bcl-2 à moins que celle-ci ait lieu suite à des échanges membranaires entre les MAM et les mitochondries. Cette hypothèse est privilégiée étant donné la proximité de physique des MAM et des mitochondries et l'absence de Bcl-2 au niveau du cytosol.

Il serait également intéressant de vérifier si ces constructions perturbent l'entrée en apoptose des cellules. Ces données pourraient nous permettre de mieux comprendre quel est le rôle fonctionnel de la redistribution de Bcl-2 lors de l'induction de l'apoptose. Il a en effet été montré que la localisation de Bcl-2 à la mitochondrie permet l'induction de l'apoptose alors que sa localisation au RE n'a pas d'effet (Wang et al., 2001).

La relocalisation du pool de bcl-2 depuis le RE vers la mitochondrie en transitant par les MAM pourrait être un événement nécessaire à l'induction de l'apoptose dans notre modèle.

Nous avons commencé à effectuer des tests d'intégration *in vitro* de protéines recombinantes sur des fractions (données non présentées). Ces tests pourraient permettre de comparer la capacité de certaines protéines à s'intégrer différemment dans des fractions de cellules saines ou apoptotiques. Il serait également intéressant de compléter les fractions de cellules saines avec certains lipides spécifiques pour mimer la composition de fractions apoptotiques.

7.2.3 Modèle d'induction de l'apoptose

L'étude des variations de compositions sphingolipidiques et de la redistribution des protéines de la famille Bcl-2 dans les fractions au cours de l'apoptose est la partie centrale de notre travail. Pour réaliser cette étude nous avons choisi un modèle d'induction de l'apoptose dans des cellules U251 par traitement à la staurosporine. Ce modèle présente plusieurs avantages techniques. La lignée U251 est couramment utilisée au laboratoire et donc particulièrement bien caractérisée. Le traitement à la staurosporine induit une entrée en apoptose rapide (quelques heures) et donc

compatible avec une méthode d'analyse longue (couplage d'un fractionnement subcellulaire et de l'UPLC-MS). La cinétique d'évènements apoptotiques a pu être facilement analysée ce qui nous a paru important pour une première approche. Par la suite, d'autres modèles d'induction de l'apoptose pourraient être utilisés pour poursuivre ce travail.

Nous parlions dans le chapitre précédent de l'importance de comparer notre modèle de cellules cancéreuses à des cellules saines. Nous avons donc commencé à mettre au point un modèle d'induction de l'apoptose *in vivo* dans des foies de souris par injection d'un anticorps J02 (anti-Fas). Il a été décrit que l'injection de cet anticorps permet d'induire l'apoptose dans les hépatocytes suite à la génération de céramide (Lin et al., 2000). Ces expériences pourraient permettre de déterminer si les modifications observées dans notre modèle relèvent d'un mécanisme général (fondamental) ou au contraire, d'un mécanisme propre à notre modèle cellulaire et donc intéressant pour la compréhension de l'induction de l'apoptose dans les gliomes.

Dans ce contexte, il serait également intéressant de réaliser le même type d'analyse après induction de l'apoptose dans les cellules U251 par d'autres stimuli, en particulier le témozolomide (TMZ) et les rayonnements ionisants qui sont les traitements de référence des gliomes (Stupp et al., 2009).

7.3 Quantification des interactions ER-Mitochondrie

Un de nos objectifs était de pouvoir quantifier les interactions entre le RE et la mitochondrie au cours de l'apoptose. Nous avons dans un premier temps envisagé de réaliser cette quantification par microscopie électronique à transmission.

Nos travaux ont effectivement permis l'observation de ces contacts dans les cellules U251. Cependant, pour plusieurs raisons cette technique s'est très vite révélée totalement inadaptée à une étude quantitative. D'un point de vue pratique, l'observation des coupes s'avère beaucoup trop longue étant donné l'importance du grossissement. L'étude d'un nombre suffisant de cellules pour une analyse statistique fiable ne semble alors pas envisageable. De plus, au sein d'un même échantillon, le nombre de contacts est très variable en fonction des champs observés. La microscopie électronique à transmission permet une observation en 2 dimensions de coupes de l'échantillon. La

visualisation des contacts est alors dépendante de l'incidence de coupe. Enfin, la validation d'un contact reste très subjective. Elle est en effet uniquement basée sur l'observation d'un rapprochement des membranes du RE et d'une mitochondrie.

Une autre option technique repose sur l'observation en microscopie électronique de fractions FM. Dans ces fractions les mitochondries ne sont pas encore purifiées. Les MAM apparaissent alors sous la forme de petites vésicules présentes à la surface des mitochondries et contenant des ribosomes. Cette approche a déjà été utilisée dans une étude pour montrer que l'accumulation de ganglioside GM1 dans les MAM entraîne une augmentation du nombre de contacts entre le RE et les mitochondries (Sano et al., 2009). Nous avons donc effectué des tests permettant effectivement d'observer les MAM sous cette forme au contact des mitochondries dans des fractions FM (Figure 35). Cependant, pour les mêmes raisons que celles concernant l'observation de cellules entières, cette technique ne paraît pas adaptée pour réaliser une étude quantitative dans notre modèle.

Nous nous sommes finalement orienté vers une troisième solution technique, la quantification des interactions entre IP3R et VDAC par PLA. Comme il a été dit précédemment, IP3R et VDAC font parti d'un complexe protéique participant à la liaison physique du RE et des mitochondries au niveau des MAM. La technique de PLA permet alors de quantifier ces interactions et d'en déduire l'intensité des contacts entre le RE et les mitochondries. Cette stratégie a d'ailleurs été utilisée et validée dans une étude très récente pour montrer que les MAM jouent un rôle dans la réponse des cellules hépatiques à l'insuline (Tubbs et al., 2014). Le marquage des interactions IP3R/VDAC est cependant en cours de mise au point et les données ne sont donc pas présentées ici. La mise au point d'un marquage par PLA peut en effet nécessiter l'utilisation de plusieurs couples d'anticorps dirigés contre plusieurs épitopes différents pour chaque protéine. La parution dans la littérature d'un protocole validé devrait nous permettre d'accélérer la mise au point dans notre modèle.



Figure 35 : Observation d'une fraction de mitochondries non purifiées (FM) par microscopie électronique à transmission. Après fractionnement un culot de la fraction FM est observé par microscopie électronique. On peut observer sur cette image une vésicule (astérisque rouge) comportant des ribosomes et collée à une mitochondrie.

7.4 Rôle de Bax et Bak dans la synthèse des sphingolipides

Une autre partie de notre travail a permis de montrer que les protéines Bax et Bak pourraient participer à la régulation de la synthèse de certains sphingolipides. Nous avons en effet constaté que l'invalidation de l'expression de Bax et Bak entraîne une diminution du taux de céramide et une augmentation de la S1P dans deux lignées cellulaires de glioblastome. Ces perturbations lipidiques sont caractéristiques d'une augmentation de la survie cellulaire (ou d'une diminution de l'apoptose). Deux hypothèses sont alors envisageables. Un rôle direct des protéines Bax et Bak sur le niveau de synthèse des ces sphingolipides ou un effet passant par la perturbation de l'homéostasie cellulaire (balance survie / apoptose).

7.4.1 Perturbation de l'homéostasie cellulaire ?

Pour vérifier si les inhibitions de Bax et Bak modifient la synthèse du céramide et de la S1P *via* une perturbation de l'homéostasie cellulaire nous avons testé l'effet de la surexpression de Bcl-2. Notre hypothèse de travail était de comparer l'inhibition de l'expression de protéines pro-apoptotiques avec la surexpression d'une protéine anti-apoptotique. Nous avons alors constaté que la surexpression de Bcl-2 n'entraîne pas de perturbation des taux de sphingolipides dans nos cellules.

7.5.2 Rôle direct ?

Ces données pourraient nous orienter vers un rôle direct des protéines Bax et Bak dans la synthèse des sphingolipides. Des études ont d'ailleurs déjà montré que Bak est nécessaire à la génération de céramide, mais toujours dans un contexte apoptotique (Beverly et al., 2013; Siskind et al., 2010).

Nous avons réalisé des tests MTT et d'activité caspases qui ont permis de déterminer que les shBax, les shBak et la surexpression de Bcl-2 n'ont pas d'impact sur le niveau d'apoptose et de prolifération cellulaire. Mais nous ne disposons pas d'outils pour étudier plus finement l'homéostasie cellulaire.

Par ailleurs, le rôle non redondant de Bax et Bak sur le niveau de synthèse de céramide et de S1P est également troublant. Il serait donc intéressant de vérifier si l'expression d'autres facteurs sont perturbés lors de l'inactivation de ces protéines.

Nos données penchent donc vers un rôle direct de Bax et Bak dans la synthèse de céramide et de S1P mais restent cependant insuffisantes pour conclure définitivement.

7.6 Implication dans les pathologies humaines

Comme il a déjà été dit précédemment, nos travaux portent sur l'étude de mécanismes fondamentaux d'induction de l'apoptose mais peuvent tout de même présenter un intérêt dans des domaines plus appliqués et notamment en cancérologie.

Des données suggèrent qu'une perturbation de la communication MAM-mitochondrie pourrait être à l'origine de défauts d'induction de l'apoptose dans les cellules cancéreuses. Il a par exemple été montré que la protéine PACS-2, qui participe au contrôle de la communication entre les MAM et les mitochondries ainsi qu'à l'adressage de Bid à la mitochondrie au cours de l'apoptose, est fréquemment mutée dans les cellules cancéreuses (Simmen et al., 2005).

Nos résultats ont permis de montrer que les MAM et les mitochondries subissent des changements de composition protéique et lipidique au cours de l'apoptose. En accord avec les données disponibles dans la littérature, nos travaux suggèrent que les MAM jouent un rôle actif dans l'induction des processus apoptotiques. De façon plus précise, en approvisionnant les mitochondries en sphingolipides spécifiques, les MAM pourraient participer à l'activation des protéines pro-apoptotiques au niveau de la membrane mitochondriale (Chipuk et al., 2012).

Nous disposons au laboratoire d'une collection de glioblastomes humains à partir desquels des primocultures ont été établies. Il serait intéressant d'étudier si la fonction des MAM décrite ci-dessus est conservée dans ces primocultures ou si au contraire des perturbations des communications entre les MAM et les mitochondries sont à l'origine de défauts d'induction de l'apoptose.

Nous avons également mis en évidence une série de différences dans la composition des fractions subcellulaires de foie et de cellules U251 à l'état basal. Il est largement admis dans la littérature que le métabolisme des sphingolipides est impliqué dans la réponse ou la résistance aux traitements (Giussani et al., 2014; Ogretmen and Hannun, 2004; Reynolds et al., 2004). La distribution intracellulaire de ces sphingolipides est déterminante dans leur rôle biologiques. De plus, nous avons montré que l'expression de Bax et Bak pouvait influencer le niveau de synthèse des sphingolipides dans deux lignées cellulaires de glioblastomes.

La caractérisation de la composition sphingolipidiques des fractions subcellulaire de notre collection de primocultures permettrait ainsi d'étudier les corrélations potentielles entre le grade des tumeurs, leur niveau de résistance aux traitements et la distribution des sphingolipides au sein de chaque fraction. Le lien entre le niveau d'expression de Bax ou Bak et le niveau de synthèse des sphingolipides pourrait également être confirmé dans ces tumeurs

Nos travaux, très descriptifs et fondamentaux, permettent néanmoins de mieux comprendre l'impact du métabolisme sphingolipidique sur l'induction de l'apoptose dans un modèle de glioblastome. Les perspectives thérapeutiques à plus long terme seront de pouvoir agir directement sur le métabolisme et/ou la localisation des sphingolipides pour améliorer l'efficacité des traitements

Cinquième Partie

Annexes

Review

Bioactive lipids and the control of Bax pro-apoptotic activity

V Mignard^{1,2}, L Lalier^{1,2,3}, F Paris^{1,2,3} and FM Vallette^{*,1,2,3}

Lipids are key regulators of cell physiology through the control of many aspects of cellular life and survival. In particular, lipids have been implicated at different levels and through many different mechanisms in the cell death program called apoptosis. Here, we discuss the action of lipids in the regulation of the activation and the integration of Bax into the mitochondrial outer membrane, a key pro-apoptotic member of the BCL-2 family. We describe how, during apoptosis, lipids can act simultaneously or in parallel as receptors or ligands for Bax to stimulate or inhibit its pro-death activity.

Cell Death and Disease (2014) 5, e1266; doi:10.1038/cddis.2014.226; published online 29 May 2014

Subject Category: Cancer

Facts

- Lipids and especially Ceramides were among the first known actors of apoptosis.
- Lipids are involved in the mitochondrial insertion of the pro-apoptotic proteins such as Bax and Bak and in the formation of oligomers.
- Lipids are constituents of the channels formed by Bax and Bak supramolecular complexes.
- Recent data have shown that lipids are also instrumental in the control of the activation phase of Bax and Bak.

Open Questions

- Is the implication of lipids in the activation of Bax and Bak an universal phenomenon?
- Is this control independent of that of BH3-only proteins (BoPs) controls?
- When and how are interactions of the lipids/proteins occurring?

Apoptosis (programmed cell death) is an essential physiological process in the development of multicellular organisms and in the maintenance of adult tissue homeostasis. Apoptosis is also involved in many pathologies, such as cardiovascular, neuro-degenerative, immunological diseases and cancer.¹ There are two distinct cellular pathways leading to apoptosis: the extrinsic pathway (or death receptor pathway) and the intrinsic pathway (also called mitochondrial pathway). The mitochondrial pathway

of apoptosis involves proteins, which have a role in other mitochondrial functions such as cytochrome *c*, but also cytosolic proteins such as the caspases or proteins partly cytosolic and partly mitochondrial such as the members of the BCL-2 family.² The extrinsic pathway is only partially independent of the mitochondrial pathway, often used as a relay or an amplifier, and is restricted to some tissue, in particular the hematological system. Other actors are implicated in this complex mechanism and pioneer studies on apoptosis have underlined the role of ions (especially calcium) and lipids (especially ceramides) in the initiation and execution phases of apoptosis. Different lipid species like ceramides, free fatty acids, diacylglycerol or cholesterol can lead to pathological cell death through signaling pathways involving proteins intrinsic to cell death programs. It has been established in the 1990s that lipid modifications, trafficking or biosynthesis are closely associated with apoptosis. Several recent reviews have described the importance of mitochondrial lipids in cell survival and death^{3–5} and recent results have in particular, shed new light on the regulation of members of the BCL-2 family through direct interactions with lipids in proximity of or in relation with mitochondria. Thus our knowledge on the control by lipids in the early phase of the induction of apoptosis has been challenged by these new findings and this is discussed in this review.

BCL-2 Family of Proteins and Apoptosis

Bcl-2 was the first protein of this family to be identified as a proto-oncogene in human follicular lymphoma.⁶ The homology between the BCL-2 family of proteins is restricted to certain

¹Centre de Recherche en Cancérologie Nantes Angers, Nantes, France; ²Université de Nantes, Nantes, France and ³Institut de Cancérologie de l'Ouest, Nantes, France

*Corresponding author: FM Vallette, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes Angers, INSERM UMR 892, CNRS UMR 6299, Université de Nantes, 8 Quai Moncousu BP 70721, 44007 Nantes, France. Tel: + 33 228 080 324; Fax: + 33 228 080 329; E-mail: francois.vallette@inserm.fr

Keywords: Bax; sphingoside; prostaglandin; lipid

Abbreviations: BH, Bcl-2 homology domain; BoP, BH3-only protein; Cox, cyclooxygenase; ER, endoplasmic reticulum; HMG-CoA, hydroxymethylglutaryl coenzyme A; MAM, mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane; MIM, mitochondrial inner membrane; MOM, mitochondrial outer membrane; MOMP, mitochondrial outer membrane permeabilization; PGA2, prostaglandin A2; PGE2, prostaglandin E2; PGES, prostaglandin synthase; PGH2, prostaglandin H2; S1P, sphingosine-1-phosphate

Received 06.2.14; revised 16.4.14; accepted 18.4.14; Edited by M Agostini

domains called BH domains (Bcl-2 homology domains), which are implicated in protein–protein interactions as well as post-translational regulation.^{7–9}

The BCL-2 family of proteins is classically divided into four groups.¹⁰

-Anti-apoptotic proteins (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, Mcl-1 and A1): these proteins contain the BH1, BH2, BH3 and BH4 domains. They are located in the cytosol but are also associated with the mitochondrial outer membrane (MOM) and the endoplasmic reticulum (ER) at different proportions. Upon induction of apoptosis, most of these proteins become membrane associated or integrated (mainly with the MOM).

-Pro-apoptotic effector proteins (Bax and Bak): these proteins are activated at the onset of apoptosis. The activation induces protein oligomerization into proteolipidic pores in the MOM, which in turn, directly induce the MOM permeabilization (MOMP).

-Direct activator pro-apoptotic proteins (Bid, Bim and Puma) are able to activate Bax and Bak through a hit and run process.

-Sensitizers or de-repressor pro-apoptotic proteins (Bad, Bik, BMF, HRK, Noxa and Puma) bind to and inhibit the anti-apoptotic proteins, leading to the release of Bax or Bak from anti-apoptotic proteins.

The latter groups (direct activator and sensitizer pro-apoptotic proteins) contain only the BH3 domain and are called BoP.

In healthy cells Bax is maintained in an inactive state under a compact configuration and is mostly located in the cytosol. A fraction of Bax is nonetheless capable of cycling between mitochondria and cytosol. Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. However, the precise function of this recycling is not known.¹¹

Bax activation induces an important protein conformational change, which leads to mitochondrial addressing through the interaction of several domains with the MOM components.^{12,13} Under pro-apoptotic condition, Bid, Bim and possibly Puma are activated and induce Bax and Bak oligomerization, MOMP and cytochrome *c* release.^{10,14,15}

The mechanism by which MOMP is achieved has been largely discussed and several models of the formation of pores or channels have been proposed: proteolipids, protein only or lipidic channels.^{14–16} It has been shown that several members of the BCL-2 family (Bcl-2, Bcl-xL, Bax, Bid...) can form channels or permeabilize artificial liposomes in a manner that recapitulate their function (that is, facilitating or inhibiting the translocation of proteins across lipid bilayers).^{17–19}

Lipids and Bax: An Apoptotic Mitochondrial Platform?

Several studies have focused recently on bioactive lipids as a new type of key molecular actors accompanying or controlling the functions of members of the BCL-2 family. For example, tBid can permeabilize liposomes by modifying membrane properties (lipid mixing and negative curvature)²⁰ and the efficiency of this permeabilization largely depends on the lipids composition of the membrane (Phosphatidylcholine, Phosphatidylethanolamine, Cardiolipin, Cholesterol).²¹ In the same way some lipids such as fatty acids (already known for their pro-apoptotic capabilities)²² are able to increase Bax

insertion and also the membrane permeabilization analyzed in liposomes.²³ However, liposomes with a composition close to ER lipid were not permeabilized by tBid and monomeric Bax, therefore, the mitochondrion-specific lipid composition is essential for membrane permeabilization by Bax or tBid.¹⁴

Thus regulation of apoptosis is not only controlled by protein–protein interactions but also by different bioactive lipids. However, two different situations can be envisaged for the Bax/lipids interactions:

Lipids as Receptors for Bax

(a) *Cholesterol*: Cholesterol is an essential cellular membrane component. It regulates membrane rigidity, membrane protein activity and as such, transmembrane signalization.²⁴ Some cells are able to take up circulating low density lipids (LDL) and high density lipids (HDL) by endocytosis. Cholesterol is also synthesized *de novo* in the ER.²⁵ Cholesterol is translocated to the MOM by vesicular trafficking or by cholesterol binding and transport proteins. Compared with the plasma membrane, cholesterol is present at low levels in the ER and mitochondria,²⁶ suggesting a tight control of its intracellular transport. Transport of cholesterol from the ER to mitochondria occurs through unique ER in close contact with mitochondria and thus termed the mitochondria-associated ER membrane (MAM).^{27,28} It has been postulated that this structure could play a major role during cell death.²⁹ Cholesterol trafficking from the MOM to the mitochondria inner membrane (MIM) requires a protein complex, which includes the translocator protein (TSPO protein).³⁰ Little is known about alteration of cholesterol transport during apoptosis but several studies suggest that inhibitors of cholesterol synthesis have pro-apoptotic properties through activation of the mitochondrial pathway.^{31–34}

The HMG-CoA reductase inhibitor lovastatin blocks mevalonate and also cholesterol synthesis. A study has shown that lovastatin treatment sensitized colorectal cancer cells to pro-apoptotic stimuli, causing an increase in Bax expression and a decrease in Bcl-2 expression.³⁵ In another study, lovastatin treatment reduced myeloma cell survival by modulation of apoptosis without modifying Bax and Bcl-2 expression.³⁶ These data were confirmed in HeLa cells treated with U18666A; a drug that induces an increase in intracellular and mitochondrial cholesterol without modifying mitochondrial morphology or apoptosis-related protein expression (Smac/Diablo, cytochrome *c*, Bcl-xL, Bax, Bak).³⁷

Proteins that interact with cholesterol have a conserved sequence called Cholesterol Recognition Amino acid Consensus and recently, this sequence has been identified in the alpha 5 helix of Bax, one of its transmembrane helices.³⁸ The role of cholesterol in Bax activity is still controversial. It has been shown by Christenson *et al.*³⁹ that the addition of cholesterol to mitochondrial membranes increases Bax binding but markedly reduces its integration into the MOM. Several other studies have suggested that the different roles of cholesterol depend on its concentration. At low concentrations cholesterol acts as a receptor for Bax facilitating its insertion (into liposomes or MOM) but not its activation or oligomerization.^{37,38,40} However, Martinou and colleagues³⁷ have shown that Bax activation is inhibited by cholesterol accumulation, essentially by decreasing its membrane

binding property. A direct link between the membrane cholesterol level and Bax activation has been proposed as in liposomes, cholesterol decreases membrane fluidity and inhibits Bax oligomerization induced by tBid without blocking its insertion.³⁷ These data show that Bax activation is not necessarily followed by its oligomerization and MOMP, suggesting that these events depend on other conditions or actors (other mitochondrial lipids or proteins).³⁷ This contention was confirmed by other studies, which showed that a high cholesterol content was an inhibitor of the transition from membrane bound to the membrane embedded status of Bax.³⁹ Thus, mitochondrial cholesterol accumulation inhibits Bax oligomerization and induces partial resistance to pro-apoptotic agents.⁴¹ The high mitochondrial cholesterol content found in many tumors may thus account, at least partially, for an inefficient Bax oligomerization, which might contribute to cancer resistance to apoptosis-inducing therapies, providing a new basis for the use of statins as anticancer agents.⁴²

(b) *Cardiolipin*: Cardiolipin (or diphosphatidylglycerol) is an anionic phospholipid. At first considered as a MIM component, cardiolipin is in fact also present in the MOM even if its percentage remains controversial (23% of total mitochondrial cardiolipin are present at the MOM,⁴³ which could correspond to 0.3-3% of mitochondrial lipids⁴⁴). However, cardiolipin has an essential role in apoptosis mitochondrial pathway.

It has been shown that the oxidation of cardiolipin present in the MIM is necessary for cytochrome *c* release.⁴⁵ Cytochrome *c* is linked to cardiolipin in the MIM. To facilitate cytochrome *c* release, cardiolipin is oxidized leading to the separation of the complex cardiolipin–cytochrome *c*. This cytochrome *c* pool formed will then be released (after Bax induced-MOMP for example).⁴⁶ Bax insertion into the MOM is sufficient to induce superoxide production and cardiolipin oxidation.⁴⁷ Cardiolipin also interacts with tBid and allows its translocation to mitochondria. It has been shown that tBid translocation to mitochondria is strongly reduced in cardiolipin-defective cells.⁴⁸

In vitro studies in liposomes have shown that cardiolipin is essential for alpha 1 helix of Bax binding to the MOM and then to Bax insertion and oligomerization.⁴⁹ Interestingly in the absence of cardiolipin some MOM proteins (not yet identified) can help Bax insertion and proteolipidic pores formation induced by Bax or tBid.⁵⁰

Cholesterol and cardiolipin are two important regulators of mitochondrial pathway of apoptosis, by interacting directly with Bid and Bax to allow or inhibit their insertion into the MOM or by modifying the properties of the mitochondrial membranes.

Lipids as Ligands for Bax

(a) *Prostaglandins*: The cyclooxygenases (Cox-1 and Cox-2) catalyze arachidonic acid transformation to prostaglandin H₂ (PGH₂). Then PGH₂ can be transformed into several others prostaglandins, predominantly PGE₂ and PGD₂ by the prostaglandins synthases (PGES and PGDS, respectively).⁵¹

Prostaglandins are secreted lipids having a key role in the modulation of the inflammatory response.⁵² It has been

known for many years that chronic inflammation significantly increases the risk of cancer.⁵³ In addition, PGE₂ can increase tumor growth by binding to G protein-coupled membrane receptors (EP receptors) leading to the activation of several cellular pathways associated with proliferation, migration, survival and angiogenesis.⁵⁴

Different Cox-2 inhibitors have also been developed for their anti-tumor activity.⁵³ Recent studies have challenged this view highlighting the important role of intracellular prostaglandins on Bax-dependent apoptosis regulation (independently of their secretion and also of EP receptor activity). An initial study identified two groups of glioblastoma multi-forme patients with different expression levels of the microsomal PGES (mPGES) and showed a correlation between high expression of mPGES and increased patient survival.⁵⁵ In fact, the high expression of mPGES leads to an increase spontaneous as well as staurosporine-induced apoptosis. Furthermore inhibition of the expression of mPGES by siRNA provokes a strong resistance to apoptosis.⁵⁵ In addition, microinjection of intracellular PGE₂ induces an increase in Bax-dependent apoptosis.⁵⁵ This effect is not dependent on the cell type as the increase in intracellular PGE₂ by microinjection or pharmacological inhibition of its export (and degradation) increases Bax-dependent apoptosis in several cancer and non-cancer cells.⁵⁶ Finally, PGE₂ directly induces a conformational change of Bax and its insertion in the MOM (on isolated mitochondria).⁵⁵ Another study shows that intracellular microinjection of prostaglandin A₂ (PGA₂), derived from the non-enzymatic dehydration of PGE₂, induces apoptosis.⁵⁷ Like PGE₂, PGA₂ is also able to induce Bax activation and mitochondrial translocation but not its oligomerization in a cell-free system.⁵⁷ Linear peptide scan assay and site-directed mutagenesis experiments showed that PGE₂ binds to ¹²⁶cys present between the two transmembrane alpha helix of Bax (alpha 5 and 6 helices) and that this cysteine is necessary for PGE₂-induced Bax activation.⁵⁷ PGD₂ can block this interaction between Bax and PGE₂ and consequently inhibit PGE₂-induced apoptosis. Interestingly, PGE₂ and Bid do not activate Bax by the same mechanism, since they do not interact in the same region of Bax, but they can rather cooperate to induce apoptosis.⁵⁷ As far as PGE₂ and PGD₂ are concerned, even if their interaction site with Bax is the same,⁵⁸ they do not trigger the same conformational changes, as visualized by fluorescence spectroscopy experiments (Figure 1). The fluorescence emission of the tryptophan is known to be very sensitive to the polarity of its environment and indicates the degree of exposure of the residue to solvent.^{59,60} The tryptophan fluorescence can be used to monitor conformational changes in native protein and protein–protein interactions. There are six tryptophan residues in Bax. Two tryptophan are localized at position 47 and 51, and the remaining four residues are localized in 100–130 region at position 100, 117, 121 and 127, that is, in the close vicinity of the interaction site between Bax and prostaglandins. Bax alone emitted fluorescence at around 339.5 nm at neutral pH. The fluorescence of pH-activated Bax (pH 4) was decreased about 50% in intensity and its emission maximum was slightly shifted to 338.5 nm. Adding PGE₂ induced a decrease of about 50% in fluorescence intensity and slightly shifted the emission peak in the same way, even if

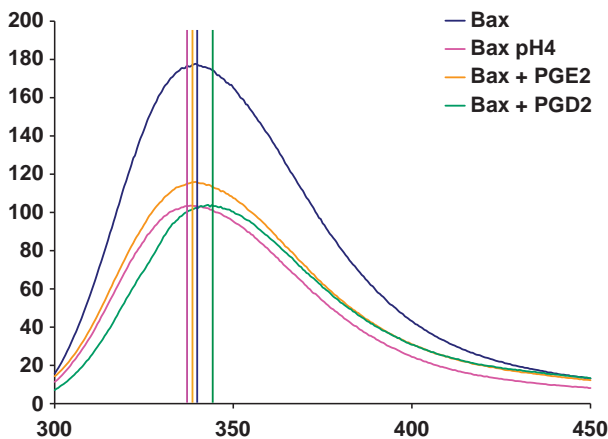


Figure 1 The interaction between prostaglandins and Bax in solution can be observed by the change in the fluorescence emission of tryptophans in Bax. Experiments were conducted with purified Bax incubated in the presence of PGE₂ or PGD₂ at pH 7. Bax protein alone emitted fluorescence around 339 nm at neutral pH, which is consistent with the fact that many tryptophan residues are exposed. The fluorescence of pH-activated Bax (pH 4) decreased about 50% in intensity and its maximum emission is slightly shifted to 338.5 nm. Incubation of Bax with PGE₂ induced a decrease of about 50% in fluorescence intensity and slightly shifted the emission peak in the same way, even if the shift was not significant. Incubation of Bax with PGD₂ decreased the fluorescence intensity about 50% and shifted the maximum emission peak from 339–343 nm. This suggests that one or several tryptophan residues are more exposed (in a polar environment) upon the interaction. Another explanation for this shift could be a decrease in the fluorescence of buried tryptophan residues induced by their interaction with PGD₂. However, it is rather improbable, especially since PGD₂ would increase the hydrophobicity around those buried residues, thus shifting the peak to a lower wavelength. These spectra suggest that PGE₂ affects the conformation of Bax in a different (or opposite) manner as compared with PGD₂, which is consistent with the opposite effect of these ligands on Bax activation⁵³

the shift was not significant. In contrast, PGD₂ induced a shift from 339.5–343.5 nm in Bax fluorescence.

These data are confirmed by other studies showing that PGA₂ inhibits cellular growth, induces cytochrome *c* release and activates the mitochondrial pathway of apoptosis in HL-60 cells (Human Promyelocytic leukemia cell line) but without establishing a direct link with BCL-2 family of proteins.^{58,61}

In short, extracellular PGE₂ induces an increase in cell proliferation via its binding to its membrane receptors,⁵⁴ but an increase in intracellular PGE₂ induces the activation of the intrinsic pathway of apoptosis by activating Bax.^{55–57}

The following model was proposed: the induction of apoptosis in cells leads to an increase in the concentration of intracellular PGE₂, which actively participates in pro-apoptotic mechanisms. PGE₂ is then secreted into the extracellular region where it has the role of a danger signal and induces cell proliferation by activating the EP receptors. This model, applicable both during tissue regeneration after injury⁶² and in tumor repopulation after treatment,⁶³ has been called the ‘Phoenix rising pathway’. These data also suggest another interesting concept; during tissue regeneration this mechanism causes the proliferation of stem and progenitor cells and involves caspase-3 and -7 and iPLA₂.⁶² It seems conceivable that the role of PGE₂ in tumor repopulation after treatment could involve a direct effect on cancer stem cells (Figure 2).

(b) *Sphingolipids*: Sphingolipids are a class of lipids containing a backbone of sphingoid bases and a set of aliphatic amino alcohols that include sphingosine. They are essential structural components of the outer leaflet of the plasma and organelle membranes of eukaryotic cells. In the nineties, their functions were reevaluated and were shown to be key actors in signaling pathways leading to inflammatory response, apoptosis, senescence, proliferation and cell migration.⁶⁴ Sphingolipids may act in signal transduction either as second messengers or by forcing the agglutination of non-soluble raft microdomains enhancing membrane proteins and receptor capping.⁶⁵ Therefore, sphingolipids contribute to the modulation of the mechanisms of cancer initiation and progression and the sensitivity to anti-tumor treatments.⁶⁶ The central actor in sphingolipid metabolism is ceramide, composed of a sphingosine and a fatty acid chain of variable length (14–24 carbon atoms), which influences the biological properties of the ceramide.⁶⁷ The level of intracellular ceramide increases in response to various cellular stresses via *de novo* synthesis involving one of the six ceramide synthase enzymes or by hydrolysis of sphingomyelin through the activation of neutral or acidic sphingomyelinase enzymes.⁶⁶ In response to stress, ceramide is considered as a bioactive lipid inducing apoptosis, cell cycle arrest and differentiation.⁶⁸

Given its pro-apoptotic role, the relationship between ceramide and the proteins of the BCL-2 family have been widely investigated. The over-expression of Bcl-2 or Bcl-xL blocks apoptosis provoked by either exogenous ceramide treatment or TNF α -induced endogenous ceramide, respectively, in ALL-697 leukemia cells⁶⁹ and MCF-7 breast carcinoma cells.⁷⁰ On the other hand, exogenous ceramide fails to induce apoptosis in Bax-deficient DU145 cells (prostate carcinoma) and HCT116 (colorectal cancer). Upon Bax transfection DU145 and HCT116 became sensitive to ceramide-induced apoptosis.⁷¹ In some cell models, redundancy between Bak and Bax activation was not observed in ceramide-induced apoptosis. For example, Bax- or Bak-deficient cells each individually mimicked ASMase deficiency and exhibited no ceramide-induced endothelial cell death after exposure to ionizing radiation.⁷² Furthermore, a feed-forward model between BH3-domain proteins and ceramide has been described. Exposure of HeLa cells to UV-radiation leads to ceramide generation and induces Bax-dependent apoptosis.⁷³ In addition, Bak (and to a lesser extent Bax) seems necessary for the long-chain ceramide generation during baby mouse kidney cell apoptosis induced by UV-C radiation or cisplatin treatment.⁷⁴ Inhibition of the anti-apoptotic Bcl-2 proteins by ABT-263 induces ceramide generation through a Bak-dependent activation of ceramide synthase in human leukemia and myeloma cell lines.⁷⁵ Ceramide generation and accumulation could be observed at the plasma membrane level as well as in cellular organelles. In fact, TNF α -induced ceramide in MCF-7 cells is concentrated in the mitochondrial membrane and is followed by Bax activation and translocation to the mitochondria. Moreover, the co-incubation of bacterial SMase and isolated mitochondria is sufficient to generate ceramide and increase Bax translocation to mitochondria.⁷⁶ In the same way, the co-incubation of exogenous C2- and C16-ceramide and isolated rat liver

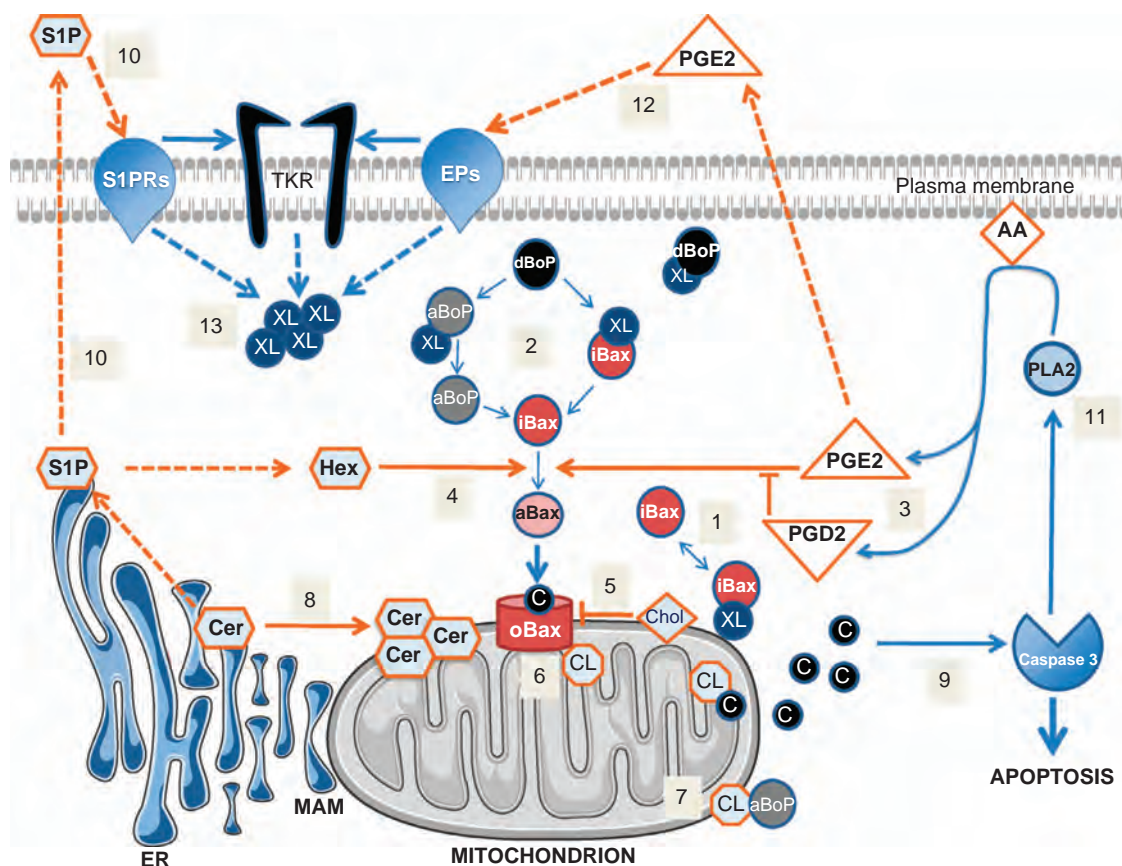


Figure 2 Activation of Bax during apoptosis is controlled by lipids at multiple levels. Inactive Bax (iBax) is predominantly cytosolic in resting cells as a monomer or associated with Bcl-xL in the cytosol or at the MOM (1). At the onset of apoptosis, derepressing BH3-only proteins (dBoP) contribute to Bax activation by releasing either Bax or activator BH3-only proteins (aBoP) from anti-apoptotic proteins (2). PGE₂ participates to this activation, while the closely related molecule PGD₂ inhibits this action (3). The S1P degradation product, Hexadecenal (Hex), can activate Bax at this step (4). Activated Bax (aBax) binds to mitochondria through its interaction with cholesterol (Chol), which when in excess inhibits Bax oligomerization (5). Oligomerization of Bax (oBax) occurs through its interaction with proteins but also with lipids including cardiolipin (CL) (6), which also facilitate tBid (an activator BH3-only protein) insertion into the MOM (7). Ceramide (Cer) can also facilitate Bax insertion into the MOM through the formation of microdomains and/or channels (8). The oligomerization of Bax and/or the formation of ceramide channels induce MOMP, the release of cytochrome c (c), activation of the caspases and subsequently apoptosis (9). S1P is a bioactive lipid molecule that can act as an intracellular messenger or is secreted where, via its G protein-coupled receptors (S1PRs) it mediates pro-survival signals and cell proliferation (10). The synthesis of PGE₂ is enhanced by caspase activation of phospholipase A₂ (PLA₂) (11). Similarly to S1P, secreted PGE₂ promotes resistance to apoptosis via G protein-coupled membrane receptors (EPs) or transactivation of the EGF Receptor (EGFR) (12). Activation of S1PR, EPs and tyrosine kinase receptors (TKR) mediates resistance to apoptosis via over-expression of Bcl-2 or Bcl-xL (13)

mitochondria potentiates the effect of Bax on the mitochondrial permeability transition.⁷⁷ In fact, MOMP induced after Bax insertion and oligomerization may be dependent of the formation of ceramide-enriched platforms in the MOM as seen in 10 Gy-irradiated HeLa cells.⁴⁰ Moreover, activated Bax has been localized preferentially in ceramide-enriched micro-membrane domains.⁴⁰ Mitochondria pre-incubated with activated Bax (by detergent or tBid) are more sensitive to MOMP induced by ceramide.⁷⁸

The importance of sphingolipids in the permeabilization of mitochondria and therefore, in the intrinsic pathway of apoptosis have been confirmed in a recent study wherein sphingolipids present in the ER cooperated with tBid-activated Bax or Bak to facilitate MOMP *in vitro*.⁷⁹ In this study, sphingosine-1-phosphate (S1P), a ceramide metabolite, interacts with Bak to induce MOMP. Moreover, the hexadecenal, S1P degradation product, interacts with Bax leading to its oligomerization and mitochondrial permeabilization. S1P have been largely described as a ceramide antagonist

inhibiting apoptosis.⁸⁰ This study challenges the conventional roles of ceramide and S1P as pro-apoptotic and pro-survival agents, respectively. Furthermore, S1P has been described to have anti-proliferative effects on certain cell types such as hepatocytes,⁸¹ T-lymphocytes,^{82,83} keratinocytes⁸⁴ and gastric cancer cells,⁸⁵ even though the exact mechanism is yet to be elucidated.

Bioactive S1P may function in both the intra and extra-cellular compartments. The extracellular S1P could have pro-survival properties through the binding to one of its specific seven transmembrane receptors.⁸⁶ In the present hypothesis, the intracellular S1P may have pro-apoptotic functions through its activation of Bak and the resulting MOMP. The potential discrepancies between intra versus extracellular S1P bioactive functions have been partially observed for PGE₂ as described in the precedent section.

Ceramides may also form channels in mitochondrial membranes. Ceramides of various chain lengths (C2 and C16) are able, at physiological concentration, to structure

pores in phospholipid membranes *in vitro*.⁸⁷ These ceramide channels are formed by a ring of anti-parallel columns composed of six ceramide molecules linked by hydrogen bonds.⁸⁷ The formation of these pores in MOM is in direct correlation with the concentration of ceramide added to the medium⁸⁸ and results in an increased conductance and therefore, in MOMP.⁸⁹ Interestingly, ceramide metabolites dihydroceramide and sphingosine inhibit the formation of ceramide pores in mitochondria.^{90,91} Again, the modulation of the ceramide channels is connected to BCL-2 protein family. If the pro-apoptotic proteins Bax and Bak do not seem essential for the formation of these channels, the anti-apoptotic protein Bcl-xL inhibits the formation of ceramide channels in isolated mitochondria.⁹² However, the ceramide channels have been observed in planar phospholipid membranes *in vitro* and in isolated mitochondria but in the absence of other molecular players and are yet to be characterized in cells. This observation will help to better define their roles in the MOMP and in apoptosis.

Concluding Remarks

We have described some of the possible roles of lipids in apoptosis as modulators of the activity of BCL-2 family members. But lipids may have many other roles during and after cell death and many other questions have to be answered. For example, the rapid appearance of phosphoserine in the outer leaflet of the plasma membrane, at the onset of apoptosis, provides an 'eat me' signal and little is known about its influence over the cell's survival programs.⁹³ The breakage of lipids, which accompanies the formation of reactive oxygen species, can also lead to modifications of membrane permeability and fluidity and, as such, can dramatically alter cell function. It is also important to find how, in dying cells, the oxidation of lipids can act on kinases implicated in survival or lethal pathways.⁹⁴ Similarly, owing to the connection between ER stress and the mitochondrial regulation of cell death^{28,95} it would be interesting to investigate the modification of lipids present in the MAM in the latter process. Several recent results have pointed out these ER-mitochondria contacts as important in several different pathologies.^{96,97}

Thus, deciphering the mechanisms by which lipid modulates the activation of survival/death signaling pathways may help to develop therapeutic strategies in the prevention of a number of diseases implicating the dysregulation of apoptosis.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements. This work was sponsored by a grant from INCA (PLBIO-2010). We thank Professor F Fleury (FRE CNRS 3478/ Université de Nantes) for his help with the circular dichroism experiments and Dr L Oliver for fruitful comments.

1. Antonsson B, Martinou J-C. The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res* 2000; **256**: 50–57.
2. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; **9**: 47–59.
3. Horvath SE, Daum G. Lipids of mitochondria. *Prog Lipid Res* 2013; **52**: 590–614.
4. Crimi M, Esposti MD. Apoptosis-induced changes in mitochondrial lipids. *Biochim Biophys Acta* 2011; **1813**: 551–557.

5. Schug ZT, Gottlieb E. Cardiolipin acts as a mitochondrial signalling platform to launch apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1788**: 2022–2031.
6. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 1985; **228**: 1440–1443.
7. Borner C, Olivier R, Martinou I, Mattmann C, Tschopp J, Martinou JC. Dissection of functional domains in Bcl-2 alpha by site-directed mutagenesis. *Biochem Cell Biol* 1994; **72**: 463–469.
8. Yin XM, Oltvai ZN, SJ Korsmeyer. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 1994; **369**: 321–323.
9. Farrow SN, Brown R. New members of the Bcl-2 family and their protein partners. *Curr Opin Genet Dev* 1996; **6**: 45–49.
10. Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR. The BCL-2 Family Reunion. *Mol Cell* 2010; **37**: 299–310.
11. Edlich F, Banerjee S, Suzuki M, Cleland MM, Arnould D, Wang C et al. Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell* 2011; **145**: 104–116.
12. Lallier L, Cartron P-F, Juin P, Nedelkina S, Manon S, Bechinger B et al. Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis* 2007; **12**: 887–896.
13. Walensky LD, Gavathiotis E. BAX unleashed: the biochemical transformation of an inactive cytosolic monomer into a toxic mitochondrial pore. *Trends Biochem Sci* 2011; **36**: 642–652.
14. Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, Ellisman MH, Latterich M, Schneider R et al. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* 2002; **111**: 331–342.
15. Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M et al. tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev* 2000; **14**: 2060–2071.
16. Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, Bonzon C, Sullivan BA, Green DR et al. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell* 2005; **17**: 525–535.
17. Schendel SL, Xie Z, Montal MO, Matsuyama S, Montal M, Reed JC. Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 5113–5118.
18. Antonsson B, Conti F, Ciavatta A, Montessuit S, Lewis S, Martinou I et al. Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* 1997; **277**: 370–372.
19. Schendel SL, Azimov R, Pawlowski K, Godzik A, Kagan BL, Reed JC. Ion channel activity of the BH3 only Bcl-2 family member, BID. *J Biol Chem* 1999; **274**: 21932–21936.
20. Epand RF, Martinou J-C, Fornalaz-Mulhauser M, Hughes DW, Epand RM. The apoptotic protein tBid promotes leakage by altering membrane curvature. *J Biol Chem* 2002; **277**: 32632–32639.
21. Zhai D, Miao Q, Xin X, Yang F. Leakage and aggregation of phospholipid vesicles induced by the BH3-only Bcl-2 family member, BID. *Eur J Biochem* 2001; **268**: 48–55.
22. Penzo D, Tagliapietra C, Colonna R, Petronilli V, Bernardi P. Effects of fatty acids on mitochondria: implications for cell death. *Biochim Biophys Acta* 2002; **1555**: 160–165.
23. Epand RF, Martinou J-C, Montessuit S, Epand RM. Fatty acids enhance membrane permeabilization by pro-apoptotic Bax. *Biochem J* 2004; **377**: 509.
24. Ikonen E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; **9**: 125–138.
25. Miller WL, Bose HS. Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking thematic review series: genetics of human lipid diseases. *J Lipid Res* 2011; **52**: 2111–2135.
26. Mesmin B, Maxfield FR. Intracellular sterol dynamics. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1791**: 636–645.
27. Kommann B. The molecular hug between the ER and the mitochondria. *Curr Opin Cell Biol* 2013; **25**: 443–448.
28. Rowland AA, Voeltz GK. Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: function of the junction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; **13**: 607–625.
29. Grimm S. The ER-mitochondria interface: the social network of cell death. *Biochim Biophys Acta* 2012; **1823**: 327–334.
30. Scarf AM, Kassou M. The Translocator protein. *J Nucl Med* 2011; **52**: 677–680.
31. Jiang Z, Zheng X, Lytle RA, Higashikubo R, Rich KM. Lovastatin-induced up-regulation of the BH3-only protein, Bim, and cell death in glioblastoma cells. *J Neurochem* 2004; **89**: 168–178.
32. Marcuzzi A, Tricarico PM, Piscianz E, Kleiner G, Brumatti LV, Crovella S. Lovastatin induces apoptosis through the mitochondrial pathway in an undifferentiated SH-SY5Y neuroblastoma cell line. *Cell Death Dis* 2013; **4**: e585.
33. Herrero-Martin G, López-Rivas A. Statins activate a mitochondria-operated pathway of apoptosis in breast tumor cells by a mechanism regulated by ErbB2 and dependent on the prenylation of proteins. *FEBS Lett* 2008; **582**: 2589–2594.
34. Cafforio P, Dammacco F, Gemone A, Silvestris F. Statins activate the mitochondrial pathway of apoptosis in human lymphoblasts and myeloma cells. *Carcinogenesis* 2005; **26**: 883–891.
35. Agarwal B, Bhendwal S, Halmos B, Moss SF, Ramey WG, Holt PR. Lovastatin augments apoptosis induced by chemotherapeutic agents in colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 1999; **5**: 2223–2229.

36. N W C J van de Donk, Kamphuis MMJ, Lokhorst HM, Bloem AC. The cholesterol lowering drug lovastatin induces cell death in myeloma plasma cells. *Leukemia* 2002; **16**: 1362–1371.
37. Lucken-Ardjomande S, Montessuit S, Martinou J-C. Bax activation and stress-induced apoptosis delayed by the accumulation of cholesterol in mitochondrial membranes. *Cell Death Differ* 2007; **15**: 484–493.
38. Martínez-Abundis E, Correa F, Rodríguez E, Soria-Castro E, Rodríguez-Zavala JS, Pacheco-Alvarez D *et al*. A CRAC-like motif in BAX sequence: relationship with protein insertion and pore activity in liposomes. *Biochim Biophys Acta* 2011; **1808**: 1888–1895.
39. Christenson E, Merlin S, Saito M, Schlesinger P. Cholesterol effects on BAX pore activation. *J Mol Biol* 2008; **381**: 1168–1183.
40. Martínez-Abundis E, Correa F, Pavón N, Zazueta C. Bax distribution into mitochondrial detergent-resistant microdomains is related to ceramide and cholesterol content in postischemic hearts. *FEBS J* 2009; **276**: 5579–5588.
41. Montero J, Morales A, Llacuna L, Lluís JM, Terrones O, Basañez G *et al*. Mitochondrial cholesterol contributes to chemotherapy resistance in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2008; **68**: 5246–5256.
42. Corcos L, Le Jossic-Corcos C. Statins: perspectives in cancer therapeutics. *Dig Liver Dis* 2013; **45**: 795–802.
43. Hovius R, Lambrechts H, Nicolay K, de Kruijff B. Improved methods to isolate and subfractionate rat liver mitochondria. Lipid composition of the inner and outer membrane. *Biochim Biophys Acta* 1990; **1021**: 217–226.
44. AIPM De Kroon, Dolis D, Mayer A, Lill R, de Kruijff B. Phospholipid composition of highly purified mitochondrial outer membranes of rat liver and *Neurospora crassa*. Is cardiolipin present in the mitochondrial outer membrane? *Biochim Biophys Acta* 1997; **1325**: 108–116.
45. Nomura K, Imai H, Koumura T, Kobayashi T, Nakagawa Y. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia-induced apoptosis. *Biochem J* 2000; **351**: 183–193.
46. Ott M, Robertson JD, Gogvadze V, Zhivotovskiy B, Orrenius S. Cytochrome C Release from mitochondria proceeds by a two-step process. *PNAS* 2002; **99**: 1259–1263.
47. Jiang J, Huang Z, Zhao Q, Feng W, Belikova NA, Kagan VE. Interplay between bax, reactive oxygen species production, and cardiolipin oxidation during apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; **368**: 145–150.
48. Lutter M, Fang M, Luo X, Nishijima M, Xie X, Wang X. Cardiolipin provides specificity for targeting of tBid to mitochondria. *Nat Cell Biol* 2000; **2**: 754–761.
49. Sani M-A, Dufourc EJ, Gröbner G. How does the Bax- α 1 targeting sequence interact with mitochondrial membranes? the role of cardiolipin. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1788**: 623–631.
50. Schafer B, Qisppe J, Choudhary V, Chipuk JE, Ajero TG, Du H *et al*. Mitochondrial outer membrane proteins assist Bid in Bax-mediated lipid pore formation. *Mol Biol Cell* 2009; **20**: 2276–2285.
51. Cha YI, Solnica-Krezel L, DuBois RN. Fishing for prostanooids: deciphering the developmental functions of cyclooxygenase-derived prostaglandins. *Dev Biol* 2006; **289**: 263–272.
52. Portranova *et al*. Selective neutralization of prostaglandin E2 blocks inflammation, hyperalgesia, and interleukin 6 production *in vivo*. *J Exp Med* 1996; **184**: 883–891.
53. Wang D, DuBois RN. Prostaglandins and cancer. *Gut* 2006; **55**: 115–122.
54. Rundhaug JE, Simper MS, Surh I, Fischer SM. The role of the EP receptors for prostaglandin E2 in skin and skin cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2011; **30**: 465–480.
55. Lallier L, Cartron P-F, Pedelaborde F, Olivier C, Loussouam D, Martin SA *et al*. Increase in PGE2 biosynthesis induces a Bax dependent apoptosis correlated to patients' survival in glioblastoma multiforme. *Oncogene* 2007; **26**: 4999–5009.
56. Lallier L, Pedelaborde F, Braud C, Menanteau J, Vallette FM, Olivier C. Increase in intracellular PGE2 induces apoptosis in Bax-expressing colon cancer cell. *BMC Cancer* 2011; **11**: 153.
57. Lallier L, Cartron P-F, Olivier C, Logé C, Bougras G, Robert J-M *et al*. Prostaglandins antagonistically control Bax activation during apoptosis. *Cell Death Differ* 2011; **18**: 528–537.
58. Kim H-S, Rhim H, Jeong S-W, Kim JW, Kim I-K. Induction of apoptosis dependent on caspase activities and growth arrest in HL-60 cells by PGA2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002; **70**: 169–183.
59. Lakowicz JR. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, 2007.
60. Callis PR, Burgess BK. Tryptophan fluorescence shifts in proteins from hybrid simulations: an electrostatic approach. *J Phys Chem B* 1997; **101**: 9429–9432.
61. Lee S-Y, Ahn J-H, Ko KW, Kim J, Jeong SW, Kim I-K *et al*. Prostaglandin A2 activates intrinsic apoptotic pathway by direct interaction with mitochondria in HL-60 cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2010; **91**: 30–37.
62. Li F, Huang Q, Chen J, Peng Y, Roop DR, Bedford JS *et al*. Apoptotic Cells activate the 'phoenix rising' pathway to promote wound healing and tissue regeneration. *Sci Signal* 2010; **3**: ra13.
63. Huang Q, Li F, Liu X, Li W, Shi W, Liu F-F *et al*. Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy. *Nat Med* 2011; **17**: 860–866.
64. Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; **9**: 139–150.
65. Corre I, Niaudet C, Paris F. Plasma membrane signaling induced by ionizing radiation. *Mutat Res* 2010; **704**: 61–67.
66. Ogretmen B, Hannun YA. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat Rev Cancer* 2004; **4**: 604–616.
67. Grösch S, Schiffmann S, Geisslinger G. Chain length-specific properties of ceramides. *Prog Lipid Res* 2012; **51**: 50–62.
68. Taha TA, Mullen TD, Obeid LM. A house divided: ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate in programmed cell death. *Biochim Biophys Acta* 2006; **1758**: 2027–2036.
69. Zhang J, Alter N, Reed JC, Borner C, Obeid LM, Hannun YA. Bcl-2 interrupts the ceramide-mediated pathway of cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 5325–5328.
70. El-Asaad W, El-Sabban M, Awaraji C, Abboushi N, Dbaibo GS. Distinct sites of action of Bcl-2 and Bcl-xL in the ceramide pathway of apoptosis. *Biochem J* 1998; **336**(Pt 3): 735–741.
71. Von Haefen C, Wieder T, Gillissen B, Stärck L, Graupner V, Dörken B *et al*. Ceramide induces mitochondrial activation and apoptosis via a Bax-dependent pathway in human carcinoma cells. *Oncogene* 2002; **21**: 4009–4019.
72. Rotolo JA, Maj JG, Feldman R, Ren D, Haimovitz-Friedman A, Cordon-Cardo C *et al*. Bax and Bak do not exhibit functional redundancy in mediating radiation-induced endothelial apoptosis in the intestinal mucosa. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008; **70**: 804–815.
73. Kashkar H, Wiegmann K, Yazdanpanah B, Haubert D, Krönke M. Acid sphingomyelinase is indispensable for UV light-induced Bax conformational change at the mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 2005; **280**: 20804–20813.
74. Siskind LJ, Mullen TD, Romero Rosales K, Clarke CJ, Hernandez-Corbacho MJ, Eninger AL *et al*. The BCL-2 protein BAK is required for long-chain ceramide generation during apoptosis. *J Biol Chem* 2010; **285**: 11818–11826.
75. Beverly LJ, Howell LA, Hernandez-Corbacho M, Casson L, Chipuk JE, Siskind LJ. BAK activation is necessary and sufficient to drive ceramide synthase-dependent ceramide accumulation following inhibition of BCL2-like proteins. *Biochem J* 2013; **452**: 111–119.
76. Birbes H, Luberto C, Hsu Y-T, El Bawab S, Hannun YA, Obeid LM. A mitochondrial pool of sphingomyelin is involved in TNF α -induced Bax translocation to mitochondria. *Biochem J* 2005; **386**: 445–451.
77. Pastorino JG, Tafani M, Rothman RJ, Marcinkeviciute A, Hoek JB, Farber JL *et al*. Functional consequences of the sustained or transient activation by Bax of the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem* 1999; **274**: 31734–31739.
78. Ganesan V, Perera M, Colombini D, Datskovskiy D, Chadha K, Colombini M. Ceramide and activated Bax act synergistically to permeabilize the mitochondrial outer membrane. *Apoptosis* 2010; **15**: 553–562.
79. Chipuk JE, McStay GP, Bharti A, Kuwana T, Clarke CJ, Siskind LJ *et al*. Sphingolipid metabolism cooperates with BAK and BAX to promote the mitochondrial pathway of apoptosis. *Cell* 2012; **148**: 988–1000.
80. Spiegel S, Milstien S. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; **4**: 397–407.
81. Ikeda H, Satoh H, Yanase M, Inoue Y, Tomiya T, Arai M *et al*. Antiproliferative property of sphingosine 1-phosphate in rat hepatocytes involves activation of Rho via Edg-5. *Gastroenterology* 2003; **124**: 459–469.
82. Dorsam G, Graeler MH, Seroogy C, Kong Y, Voice JK, Goetzl EJ. Transduction of multiple effects of sphingosine 1-phosphate (S1P) on T cell functions by the S1P1 G protein-coupled receptor. *J Immunol* 2003; **171**: 3500–3507.
83. Jin Y, Knudsen E, Wang L, Bryceson Y, Damaj B, Gessani S *et al*. Sphingosine 1-phosphate is a novel inhibitor of T-cell proliferation. *Blood* 2003; **101**: 4909–4915.
84. Kim D-S, Kim S-Y, Kleuser B, Schäfer-Korting M, Kim KH, Park K-C. Sphingosine-1-phosphate inhibits human keratinocyte proliferation via Akt/protein kinase B inactivation. *Cell Signal* 2004; **16**: 89–95.
85. Yamashita H, Kitayama J, Shida D, Yamaguchi H, Mori K, Osada M *et al*. Sphingosine 1-phosphate receptor expression profile in human gastric cancer cells: differential regulation on the migration and proliferation. *J Surg Res* 2006; **130**: 80–87.
86. Young N, Van Brocklyn JR. Signal transduction of sphingosine-1-phosphate g protein-coupled receptors. *ScientificWorldJournal* 2006; **6**: 946–966.
87. Siskind LJ, Colombini M. The lipids C2- and C16-ceramide form large stable channels. Implications for apoptosis. *J Biol Chem* 2000; **275**: 38640–38644.
88. Siskind LJ, Kolesnick RN, Colombini M. Ceramide forms channels in mitochondrial outer membranes at physiologically relevant concentrations. *Mitochondrion* 2006; **6**: 118–125.
89. Siskind LJ, Kolesnick RN, Colombini M. Ceramide channels increase the permeability of the mitochondrial outer membrane to small proteins. *J Biol Chem* 2002; **277**: 26796–26803.
90. Stiban J, Fistere D, Colombini M. Dihydroceramide hinders ceramide channel formation: implications on apoptosis. *Apoptosis* 2006; **11**: 773–780.
91. Elrick MJ, Fluss S, Colombini M. Sphingosine a product of ceramide hydrolysis, influences the formation of ceramide channels. *Biophys J* 2006; **91**: 1749–1756.

92. Siskind LJ, Feinstein L, Yu T, Davis JS, Jones D, Choi J *et al*. Anti-apoptotic Bcl-2 family proteins disassemble ceramide channels. *J Biol Chem* 2008; **283**: 6622–6630.
93. Clark MR. Flippin' lipids. *Nat Immunol* 2011; **12**: 373–375.
94. Newton AC. Lipid activation of protein kinases. *J Lipid Res* 2009; **3**: ra13.
95. Vannuvel K, Renard P, Raes M, Arnould T. Functional and morphological impact of ER stress on mitochondria. *J Cell Physiol* 2013; **228**: 1802–1818.
96. Paillard M, Tubbs E, Thiebaut P-A, Gomez L, Fauconnier J, Da Silva CC *et al*. Depressing mitochondria-reticulum interactions protects cardiomyocytes from lethal hypoxia-reoxygenation injury. *Circulation* 2013; **128**: 1555–1565.
97. Hedskog L, Pinho CM, Filadi R, Rönnbäck A, Hertwig L, Wiehager B *et al*. Modulation of the endoplasmic reticulum-mitochondria interface in Alzheimer's disease and related models. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; **110**: 7916–7921.



Cell Death and Disease is an open-access journal published by *Nature Publishing Group*. This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

Bibliographie

Achleitner, G., Gaigg, B., Krasser, A., Kainersdorfer, E., Kohlwein, S.D., Perktold, A., Zellnig, G., and Daum, G. (1999). Association between the endoplasmic reticulum and mitochondria of yeast facilitates interorganelle transport of phospholipids through membrane contact. *Eur. J. Biochem. FEBS* 264, 545–553.

Agarwal, B., Bhendwal, S., Halmos, B., Moss, S.F., Ramey, W.G., and Holt, P.R. (1999). Lovastatin augments apoptosis induced by chemotherapeutic agents in colon cancer cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 5, 2223–2229.

Akl, H., Vervloessem, T., Kiviluoto, S., Bittremieux, M., Parys, J.B., De Smedt, H., and Bultynck, G. (2014). A dual role for the anti-apoptotic Bcl-2 protein in cancer: mitochondria versus endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta* 1843, 2240–2252.

Andrieu-Abadie, N., and Levade, T. (2002). Sphingomyelin hydrolysis during apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1585, 126–134.

Antonsson, B., Montessuit, S., Lauper, S., Eskes, R., and Martinou, J.C. (2000). Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem. J.* 345 Pt 2, 271–278.

Antonsson, B., Montessuit, S., Sanchez, B., and Martinou, J.C. (2001). Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J. Biol. Chem.* 276, 11615–11623.

Ardail, D., Gasnier, F., Lermé, F., Simonot, C., Louisot, P., and Gateau-Roesch, O. (1993). Involvement of mitochondrial contact sites in the subcellular compartmentalization of phospholipid biosynthetic enzymes. *J. Biol. Chem.* 268, 25985–25992.

Ardail, D., Popa, I., Alcantara, K., Pons, A., Zanetta, J.P., Louisot, P., Thomas, L., and Portoukalian, J. (2001). Occurrence of ceramides and neutral glycolipids with unusual long-chain base composition in purified rat liver mitochondria. *FEBS Lett.* 488, 160–164.

Ardail, D., Popa, I., Bodennec, J., Louisot, P., Schmitt, D., and Portoukalian, J. (2003). The mitochondria-associated endoplasmic-reticulum subcompartment (MAM fraction) of rat liver contains highly active sphingolipid-specific glycosyltransferases. *Biochem. J.* 371, 1013–1019.

Area-Gomez, E., Del Carmen Lara Castillo, M., Tambini, M.D., Guardia-Laguarta, C., de Groof, A.J.C., Madra, M., Ikenouchi, J., Umeda, M., Bird, T.D., Sturley, S.L., et al. (2012). Upregulated function of mitochondria-associated ER membranes in Alzheimer disease. *EMBO J.* 31, 4106–4123.

Ashkenazi, A., and Dixit, V.M. (1998). Death Receptors: Signaling and Modulation. *Science* 281, 1305–1308.

Axe, E.L., Walker, S.A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H.L., Habermann, A., Griffiths, G., and Ktistakis, N.T. (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* *182*, 685–701.

Bach, D., Naon, D., Pich, S., Soriano, F.X., Vega, N., Rieusset, J., Laville, M., Guillet, C., Boirie, Y., Wallberg-Henriksson, H., et al. (2005). Expression of Mfn2, the Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Type 2A Gene, in Human Skeletal Muscle Effects of Type 2 Diabetes, Obesity, Weight Loss, and the Regulatory Role of Tumor Necrosis Factor α and Interleukin-6. *Diabetes* *54*, 2685–2693.

Bartke, N., and Hannun, Y.A. (2009). Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *J. Lipid Res.* *50 Suppl*, S91–S96.

Basañez, G., Nechushtan, A., Drozhinin, O., Chanturiya, A., Choe, E., Tutt, S., Wood, K.A., Hsu, Y., Zimmerberg, J., and Youle, R.J. (1999). Bax, but not Bcl-xL, decreases the lifetime of planar phospholipid bilayer membranes at subnanomolar concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 5492–5497.

Bassik, M.C., Scorrano, L., Oakes, S.A., Pozzan, T., and Korsmeyer, S.J. (2004). Phosphorylation of BCL-2 regulates ER Ca²⁺ homeostasis and apoptosis. *EMBO J.* *23*, 1207–1216.

Bellot, G., Cartron, P.-F., Er, E., Oliver, L., Juin, P., Armstrong, L.C., Bornstein, P., Mihara, K., Manon, S., and Vallette, F.M. (2007). TOM22, a core component of the mitochondria outer membrane protein translocation pore, is a mitochondrial receptor for the proapoptotic protein Bax. *Cell Death Differ.* *14*, 785–794.

Betz, C., Stracka, D., Prescianotto-Baschong, C., Frieden, M., Demaurex, N., and Hall, M.N. (2013). Feature Article: mTOR complex 2-Akt signaling at mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) regulates mitochondrial physiology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 12526–12534.

Beverly, L.J., Howell, L.A., Hernandez-Corbacho, M., Casson, L., Chipuk, J.E., and Siskind, L.J. (2013). BAK activation is necessary and sufficient to drive ceramide synthase-dependent ceramide accumulation following inhibition of BCL2-like proteins. *Biochem. J.* *452*, 111–119.

Bionda, C., Portoukalian, J., Schmitt, D., Rodriguez-Lafrasse, C., and Ardail, D. (2004). Subcellular compartmentalization of ceramide metabolism: MAM (mitochondria-associated membrane) and/or mitochondria? *Biochem. J.* *382*, 527–533.

Birbes, H., Luberto, C., Hsu, Y.-T., El Bawab, S., Hannun, Y.A., and Obeid, L.M. (2005). A mitochondrial pool of sphingomyelin is involved in TNF α -induced Bax translocation to mitochondria. *Biochem. J.* *386*, 445–451.

Boitier, E., Rea, R., and Duchen, M.R. (1999). Mitochondria exert a negative feedback on the propagation of intracellular Ca²⁺ waves in rat cortical astrocytes. *J. Cell Biol.* *145*, 795–808.

- Borner, C., Olivier, R., Martinou, I., Mattmann, C., Tschopp, J., and Martinou, J.C. (1994). Dissection of functional domains in Bcl-2 alpha by site-directed mutagenesis. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* *72*, 463–469.
- Bose, R., Verheij, M., Haimovitz-Friedman, A., Scotto, K., Fuks, Z., and Kolesnick, R. (1995). Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: an alternative mechanism for generating death signals. *Cell* *82*, 405–414.
- Bossy-Wetzell, E., Newmeyer, D.D., and Green, D.R. (1998). Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO J.* *17*, 37–49.
- De Brito, O.M., and Scorrano, L. (2008). Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* *456*, 605–610.
- Brouwer, J.M., Westphal, D., Dewson, G., Robin, A.Y., Uren, R.T., Bartolo, R., Thompson, G.V., Colman, P.M., Kluck, R.M., and Czabotar, P.E. (2014). Bak Core and Latch Domains Separate during Activation, and Freed Core Domains Form Symmetric Homodimers. *Mol. Cell.*
- Burman, J.L., Yu, S., Poole, A.C., Decal, R.B., and Pallanck, L. (2012). Analysis of neural subtypes reveals selective mitochondrial dysfunction in dopaminergic neurons from parkin mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 10438–10443.
- Cafforio, P., Dammacco, F., Gernone, A., and Silvestris, F. (2005). Statins activate the mitochondrial pathway of apoptosis in human lymphoblasts and myeloma cells. *Carcinogenesis* *26*, 883–891.
- Callis, P.R., and Burgess, B.K. (1997). Tryptophan Fluorescence Shifts in Proteins from Hybrid Simulations: An Electrostatic Approach. *J. Phys. Chem. B* *101*, 9429–9432.
- Cartron, P.-F., Priault, M., Oliver, L., Meflah, K., Manon, S., and Vallette, F.M. (2003). The N-terminal end of Bax contains a mitochondrial-targeting signal. *J. Biol. Chem.* *278*, 11633–11641.
- 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.
- Cartron, P.-F., Bellot, G., Oliver, L., Grandier-Vazeille, X., Manon, S., and Vallette, F.M. (2008). Bax inserts into the mitochondrial outer membrane by different mechanisms. *FEBS Lett.* *582*, 3045–3051.
- Cha, Y.I., Solnica-Krezel, L., and DuBois, R.N. (2006). Fishing for prostanoids: Deciphering the developmental functions of cyclooxygenase-derived prostaglandins. *Dev. Biol.* *289*, 263–272.
- Chalfant, C.E., Ogretmen, B., Galadari, S., Kroesen, B.J., Pettus, B.J., and Hannun, Y.A. (2001). FAS activation induces dephosphorylation of SR proteins; dependence on the de

novo generation of ceramide and activation of protein phosphatase 1. *J. Biol. Chem.* *276*, 44848–44855.

Chen, L., Willis, S.N., Wei, A., Smith, B.J., Fletcher, J.I., Hinds, M.G., Colman, P.M., Day, C.L., Adams, J.M., and Huang, D.C.S. (2005). Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol. Cell* *17*, 393–403.

Chipuk, J.E., Fisher, J.C., Dillon, C.P., Kriwacki, R.W., Kuwana, T., and Green, D.R. (2008). Mechanism of apoptosis induction by inhibition of the anti-apoptotic BCL-2 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 20327–20332.

Chipuk, J.E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M.J., and Green, D.R. (2010). The BCL-2 Family Reunion. *Mol. Cell* *37*, 299–310.

Chipuk, J.E., McStay, G.P., Bharti, A., Kuwana, T., Clarke, C.J., Siskind, L.J., Obeid, L.M., and Green, D.R. (2012). Sphingolipid metabolism cooperates with BAK and BAX to promote the mitochondrial pathway of apoptosis. *Cell* *148*, 988–1000.

Cho, H., Mu, J., Kim, J.K., Thorvaldsen, J.L., Chu, Q., Crenshaw, E.B., Kaestner, K.H., Bartolomei, M.S., Shulman, G.I., and Birnbaum, M.J. (2001). Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science* *292*, 1728–1731.

Chou, C.-H., Lee, R.-S., and Yang-Yen, H.-F. (2006). An internal EELD domain facilitates mitochondrial targeting of Mcl-1 via a Tom70-dependent pathway. *Mol. Biol. Cell* *17*, 3952–3963.

Christenson, E., Merlin, S., Saito, M., and Schlesinger, P. (2008). Cholesterol effects on BAX pore activation. *J. Mol. Biol.* *381*, 1168–1183.

Cohen, G.M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* *326 (Pt 1)*, 1–16.

Copeland, D.E., and Dalton, A.J. (1959). An association between mitochondria and the endoplasmic reticulum in cells of the pseudobranch gland of a teleost. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* *5*, 393–396.

Corcos, L., and Le Jossic-Corcos, C. (2013). Statins: perspectives in cancer therapeutics. *Dig. Liver Dis. Off. J. Ital. Soc. Gastroenterol. Ital. Assoc. Study Liver* *45*, 795–802.

Crimi, M., and Esposti, M.D. (2011). Apoptosis-induced changes in mitochondrial lipids. *Biochim. Biophys. Acta* *1813*, 551–557.

Csordas, G. (1999). Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria. *EMBO J.* *18*, 96–108.

Csordás, G., Renken, C., Várnai, P., Walter, L., Weaver, D., Buttle, K.F., Balla, T., Mannella, C.A., and Hajnóczky, G. (2006). Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *J. Cell Biol.* *174*, 915–921.

- Cuervo, A.M. (2010). The plasma membrane brings autophagosomes to life. *Nat. Cell Biol.* *12*, 735–737.
- Cuvillier, O., and Levade, T. (2001). Sphingosine 1-phosphate antagonizes apoptosis of human leukemia cells by inhibiting release of cytochrome c and Smac/DIABLO from mitochondria. *Blood* *98*, 2828–2836.
- Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P.G., Coso, O.A., Gutkind, S., and Spiegel, S. (1996). Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* *381*, 800–803.
- Cuvillier, O., Rosenthal, D.S., Smulson, M.E., and Spiegel, S. (1998). Sphingosine 1-phosphate inhibits activation of caspases that cleave poly(ADP-ribose) polymerase and lamins during Fas- and ceramide-mediated apoptosis in Jurkat T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* *273*, 2910–2916.
- Czabotar, P.E., Westphal, D., Dewson, G., Ma, S., Hockings, C., Fairlie, W.D., Lee, E.F., Yao, S., Robin, A.Y., Smith, B.J., et al. (2013). Bax Crystal Structures Reveal How BH3 Domains Activate Bax and Nucleate Its Oligomerization to Induce Apoptosis. *Cell* *152*, 519–531.
- Denton, R.M. (2009). Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Biochim. Biophys. Acta* *1787*, 1309–1316.
- Dewson, G., Kratina, T., Czabotar, P., Day, C.L., Adams, J.M., and Kluck, R.M. (2009). Bak activation for apoptosis involves oligomerization of dimers via their alpha6 helices. *Mol. Cell* *36*, 696–703.
- Dijkers, P.F., Medema, R.H., Lammers, J.W., Koenderman, L., and Coffey, P.J. (2000). Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr. Biol. CB* *10*, 1201–1204.
- Dlugosz, P.J., Billen, L.P., Annis, M.G., Zhu, W., Zhang, Z., Lin, J., Leber, B., and Andrews, D.W. (2006). Bcl-2 changes conformation to inhibit Bax oligomerization. *EMBO J.* *25*, 2287–2296.
- Van de Donk, N.W.C.J., Kamphuis, M.M.J., Lokhorst, H.M., and Bloem, A.C. (2002). The cholesterol lowering drug lovastatin induces cell death in myeloma plasma cells. *Leukemia* *16*, 1362–1371.
- Dorsam, G., Graeler, M.H., Seroogy, C., Kong, Y., Voice, J.K., and Goetzl, E.J. (2003). Transduction of multiple effects of sphingosine 1-phosphate (S1P) on T cell functions by the S1P1 G protein-coupled receptor. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *171*, 3500–3507.
- Dromparis, P., Sutendra, G., and Michelakis, E.D. (2010). The role of mitochondria in pulmonary vascular remodeling. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* *88*, 1003–1010.
- Edlich, F., Banerjee, S., Suzuki, M., Cleland, M.M., Arnoult, D., Wang, C., Neutzner, A., Tjandra, N., and Youle, R.J. (2011). Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell* *145*, 104–116.

- Edsall, L.C., Pirianov, G.G., and Spiegel, S. (1997). Involvement of sphingosine 1-phosphate in nerve growth factor-mediated neuronal survival and differentiation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *17*, 6952–6960.
- El-Assaad, W., El-Sabban, M., Awaraji, C., Abboushi, N., and Dbaibo, G.S. (1998). Distinct sites of action of Bcl-2 and Bcl-xL in the ceramide pathway of apoptosis. *Biochem. J.* *336* (Pt 3), 735–741.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* *35*, 495–516.
- Elrick, M.J., Fluss, S., and Colombini, M. (2006). Sphingosine, a product of ceramide hydrolysis, influences the formation of ceramide channels. *Biophys. J.* *91*, 1749–1756.
- Epanand, R.F., Martinou, J.-C., Montessuit, S., Epanand, R.M., and Yip, C.M. (2002). Direct evidence for membrane pore formation by the apoptotic protein Bax. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *298*, 744–749.
- Epanand, R.F., Martinou, J.-C., Montessuit, S., and Epanand, R.M. (2004). Fatty acids enhance membrane permeabilization by pro-apoptotic Bax. *Biochem. J.* *377*, 509.
- Er, E., Oliver, L., Cartron, P.-F., Juin, P., Manon, S., and Vallette, F.M. (2006). Mitochondria as the target of the pro-apoptotic protein Bax. *Biochim. Biophys. Acta* *1757*, 1301–1311.
- Evan, G., and Littlewood, T. (1998). A Matter of Life and Cell Death. *Science* *281*, 1317–1322.
- Fadok, V.A., Bratton, D.L., Frasch, S.C., Warner, M.L., and Henson, P.M. (1998). The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ.* *5*, 551–562.
- Farrow, S.N., and Brown, R. (1996). New members of the Bcl-2 family and their protein partners. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *6*, 45–49.
- Feo, F., Canuto, R.A., Bertone, G., Garcea, R., and Pani, P. (1973). Cholesterol and phospholipid composition of mitochondria and microsomes isolated from morris hepatoma 5123 and rat liver. *FEBS Lett.* *33*, 229–232.
- Frank, S., Gaume, B., Bergmann-Leitner, E.S., Leitner, W.W., Robert, E.G., Catez, F., Smith, C.L., and Youle, R.J. (2001). The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev. Cell* *1*, 515–525.
- Friedman, J.R., Lackner, L.L., West, M., DiBenedetto, J.R., Nunnari, J., and Voeltz, G.K. (2011). ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science* *334*, 358–362.
- Gavathiotis, E., Suzuki, M., Davis, M.L., Pitter, K., Bird, G.H., Katz, S.G., Tu, H.-C., Kim, H., Cheng, E.H.-Y., Tjandra, N., et al. (2008). BAX activation is initiated at a novel interaction site. *Nature* *455*, 1076–1081.
- De Giorgi, F., Lartigue, L., Bauer, M.K.A., Schubert, A., Grimm, S., Hanson, G.T., Remington, S.J., Youle, R.J., and Ichas, F. (2002). The permeability transition pore signals apoptosis

by directing Bax translocation and multimerization. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *16*, 607–609.

Giussani, P., Tringali, C., Riboni, L., Viani, P., and Venerando, B. (2014). Sphingolipids: Key Regulators of Apoptosis and Pivotal Players in Cancer Drug Resistance. *Int. J. Mol. Sci.* *15*, 4356–4392.

Grösch, S., Schiffmann, S., and Geisslinger, G. (2012). Chain length-specific properties of ceramides. *Prog. Lipid Res.* *51*, 50–62.

Gruss, H.J., and Dower, S.K. (1995). Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood* *85*, 3378–3404.

Guo, X., Macleod, G.T., Wellington, A., Hu, F., Panchumarthi, S., Schoenfield, M., Marin, L., Charlton, M.P., Atwood, H.L., and Zinsmaier, K.E. (2005). The GTPase dMiro is required for axonal transport of mitochondria to *Drosophila* synapses. *Neuron* *47*, 379–393.

Von Haefen, C., Wieder, T., Gillissen, B., Stärck, L., Graupner, V., Dörken, B., and Daniel, P.T. (2002). Ceramide induces mitochondrial activation and apoptosis via a Bax-dependent pathway in human carcinoma cells. *Oncogene* *21*, 4009–4019.

Hailey, D.W., Rambold, A.S., Satpute-Krishnan, P., Mitra, K., Sougrat, R., Kim, P.K., and Lippincott-Schwartz, J. (2010). Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* *141*, 656–667.

Haimovitz-Friedman, A., Kan, C.C., Ehleiter, D., Persaud, R.S., McLoughlin, M., Fuks, Z., and Kolesnick, R.N. (1994). Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *J. Exp. Med.* *180*, 525–535.

Hamasaki, M., Furuta, N., Matsuda, A., Nezu, A., Yamamoto, A., Fujita, N., Oomori, H., Noda, T., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., et al. (2013). Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature* *495*, 389–393.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* *100*, 57–70.

Hannun, Y.A. (1996). Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* *274*, 1855–1859.

Hannun, Y.A., and Obeid, L.M. (2008). Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 139–150.

Hayashi-Nishino, M., Fujita, N., Noda, T., Yamaguchi, A., Yoshimori, T., and Yamamoto, A. (2009). A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat. Cell Biol.* *11*, 1433–1437.

Herrero-Martin, G., and López-Rivas, A. (2008). Statins activate a mitochondria-operated pathway of apoptosis in breast tumor cells by a mechanism regulated by ErbB2 and dependent on the prenylation of proteins. *FEBS Lett.* *582*, 2589–2594.

Hoppins, S., and Nunnari, J. (2012). Cell Biology. Mitochondrial dynamics and apoptosis--the ER connection. *Science* *337*, 1052–1054.

- Horvath, S.E., and Daum, G. (2013). Lipids of mitochondria. *Prog. Lipid Res.* *52*, 590–614.
- Hovius, R., Lambrechts, H., Nicolay, K., and de Kruijff, B. (1990). Improved methods to isolate and subfractionate rat liver mitochondria. Lipid composition of the inner and outer membrane. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *1021*, 217–226.
- Huang, C.-Y., Chiang, S.-F., Lin, T.-Y., Chiou, S.-H., and Chow, K.-C. (2012). HIV-1 Vpr triggers mitochondrial destruction by impairing Mfn2-mediated ER-mitochondria interaction. *PloS One* *7*, e33657.
- Huang, Q., Li, F., Liu, X., Li, W., Shi, W., Liu, F.-F., O'Sullivan, B., He, Z., Peng, Y., Tan, A.-C., et al. (2011). Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy. *Nat. Med.* *17*, 860–866.
- Ichikawa, S., and Hirabayashi, Y. (1998). Glucosylceramide synthase and glycosphingolipid synthesis. *Trends Cell Biol.* *8*, 198–202.
- Ikeda, H., Satoh, H., Yanase, M., Inoue, Y., Tomiya, T., Arai, M., Tejima, K., Nagashima, K., Maekawa, H., Yahagi, N., et al. (2003). Antiproliferative property of sphingosine 1-phosphate in rat hepatocytes involves activation of Rho via Edg-5. *Gastroenterology* *124*, 459–469.
- Ikonen, E. (2008). Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 125–138.
- Ishikawa, H., Ma, Z., and Barber, G.N. (2009). STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* *461*, 788–792.
- Iwasawa, R., Mahul-Mellier, A.-L., Datler, C., Pazarentzos, E., and Grimm, S. (2011). Fis1 and Bap31 bridge the mitochondria-ER interface to establish a platform for apoptosis induction. *EMBO J.* *30*, 556–568.
- Jiang, J., Huang, Z., Zhao, Q., Feng, W., Belikova, N.A., and Kagan, V.E. (2008). Interplay between bax, reactive oxygen species production, and cardiolipin oxidation during apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *368*, 145–150.
- Jiang, Z., Zheng, X., Lytle, R.A., Higashikubo, R., and Rich, K.M. (2004). Lovastatin-induced up-regulation of the BH3-only protein, Bim, and cell death in glioblastoma cells. *J. Neurochem.* *89*, 168–178.
- Jin, J., Hou, Q., Mullen, T.D., Zeidan, Y.H., Bielawski, J., Kraveka, J.M., Bielawska, A., Obeid, L.M., Hannun, Y.A., and Hsu, Y.-T. (2008). Ceramide generated by sphingomyelin hydrolysis and the salvage pathway is involved in hypoxia/reoxygenation-induced Bax redistribution to mitochondria in NT-2 cells. *J. Biol. Chem.* *283*, 26509–26517.
- Jin, Y., Knudsen, E., Wang, L., Bryceson, Y., Damaj, B., Gessani, S., and Maghazachi, A.A. (2003). Sphingosine 1-phosphate is a novel inhibitor of T-cell proliferation. *Blood* *101*, 4909–4915.

- Jürgensmeier, J.M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D., and Reed, J.C. (1998). Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 4997–5002.
- Kaley, G., and Weiner, R. (1971). Prostaglandin E-1: a potential mediator of the inflammatory response. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *180*, 338–350.
- Karbowski, M., Lee, Y.-J., Gaume, B., Jeong, S.-Y., Frank, S., Nechushtan, A., Santel, A., Fuller, M., Smith, C.L., and Youle, R.J. (2002). Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. *J. Cell Biol.* *159*, 931–938.
- Kashkar, H., Wiegmann, K., Yazdanpanah, B., Haubert, D., and Krönke, M. (2005). Acid sphingomyelinase is indispensable for UV light-induced Bax conformational change at the mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* *280*, 20804–20813.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *Br. J. Cancer* *26*, 239–257.
- Kim, D.-S., Kim, S.-Y., Kleuser, B., Schäfer-Korting, M., Kim, K.H., and Park, K.-C. (2004). Sphingosine-1-phosphate inhibits human keratinocyte proliferation via Akt/protein kinase B inactivation. *Cell. Signal.* *16*, 89–95.
- Kim, H., Tu, H.-C., Ren, D., Takeuchi, O., Jeffers, J.R., Zambetti, G.P., Hsieh, J.J.-D., and Cheng, E.H.-Y. (2009). Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis. *Mol. Cell* *36*, 487–499.
- Kim, H.-S., Rhim, H., Jeong, S.-W., Kim, J.W., and Kim, I.-K. (2002). Induction of apoptosis dependent on caspase activities and growth arrest in HL-60 cells by PGA2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* *70*, 169–183.
- Kirschnek, S., Paris, F., Weller, M., Grassme, H., Ferlinz, K., Riehle, A., Fuks, Z., Kolesnick, R., and Gulbins, E. (2000). CD95-mediated apoptosis in vivo involves acid sphingomyelinase. *J. Biol. Chem.* *275*, 27316–27323.
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* *14*, 5579–5588.
- Kleuser, B., Cuvillier, O., and Spiegel, S. (1998). 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits programmed cell death in HL-60 cells by activation of sphingosine kinase. *Cancer Res.* *58*, 1817–1824.
- Knott, A.B., Perkins, G., Schwarzenbacher, R., and Bossy-Wetzel, E. (2008). Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* *9*, 505–518.
- Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M.M., Dickson, R., and Spiegel, S. (1998). Molecular cloning and functional characterization of murine sphingosine kinase. *J. Biol. Chem.* *273*, 23722–23728.

- Kornmann, B. (2013). The molecular hug between the ER and the mitochondria. *Curr. Opin. Cell Biol.* *25*, 443–448.
- Kornmann, B., Currie, E., Collins, S.R., Schuldiner, M., Nunnari, J., Weissman, J.S., and Walter, P. (2009). An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science* *325*, 477–481.
- Kornmann, B., Osman, C., and Walter, P. (2011). The conserved GTPase Gem1 regulates endoplasmic reticulum-mitochondria connections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 14151–14156.
- Korsmeyer, S.J. (1992). Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood* *80*, 879–886.
- De Kroon, A.I.P.M., Dolis, D., Mayer, A., Lill, R., and de Kruijff, B. (1997). Phospholipid composition of highly purified mitochondrial outer membranes of rat liver and *Neurospora crassa*. Is cardiolipin present in the mitochondrial outer membrane? *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *1325*, 108–116.
- Kuwana, T., Mackey, M.R., Perkins, G., Ellisman, M.H., Latterich, M., Schneider, R., Green, D.R., and Newmeyer, D.D. (2002). Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* *111*, 331–342.
- Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Chipuk, J.E., Bonzon, C., Sullivan, B.A., Green, D.R., and Newmeyer, D.D. (2005). BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol. Cell* *17*, 525–535.
- Lakowicz, J.R. (2007). *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (Springer).
- Lalier, L., Cartron, P.-F., Juin, P., Nedelkina, S., Manon, S., Bechinger, B., and Vallette, F.M. (2007a). Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* *12*, 887–896.
- Lalier, L., Cartron, P.-F., Pedelaborde, F., Olivier, C., Loussouarn, D., Martin, S.A., Meflah, K., Menanteau, J., and Vallette, F.M. (2007b). Increase in PGE2 biosynthesis induces a Bax dependent apoptosis correlated to patients' survival in glioblastoma multiforme. *Oncogene* *26*, 4999–5009.
- Lalier, L., Pedelaborde, F., Braud, C., Menanteau, J., Vallette, F.M., and Olivier, C. (2011a). Increase in intracellular PGE2 induces apoptosis in Bax-expressing colon cancer cell. *BMC Cancer* *11*, 153.
- Lalier, L., Cartron, P.-F., Olivier, C., Logé, C., Bougras, G., Robert, J.-M., Oliver, L., and Vallette, F.M. (2011b). Prostaglandins antagonistically control Bax activation during apoptosis. *Cell Death Differ.* *18*, 528–537.
- Lee, H., Rotolo, J.A., Mesicek, J., Penate-Medina, T., Rimner, A., Liao, W.-C., Yin, X., Ragupathi, G., Ehleiter, D., Gulbins, E., et al. (2011). Mitochondrial ceramide-rich macrodomains functionalize Bax upon irradiation. *PloS One* *6*, e19783.

- Lee, S.-Y., Ahn, J.-H., Ko, K.W., Kim, J., Jeong, S.W., Kim, I.-K., Kim, J., and Kim, H.-S. (2010). Prostaglandin A2 activates intrinsic apoptotic pathway by direct interaction with mitochondria in HL-60 cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* *91*, 30–37.
- Letai, A., Bassik, M.C., Walensky, L.D., Sorcinelli, M.D., Weiler, S., and Korsmeyer, S.J. (2002). Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* *2*, 183–192.
- Li, F., Huang, Q., Chen, J., Peng, Y., Roop, D.R., Bedford, J.S., and Li, C.-Y. (2010). Apoptotic Cells Activate the “Phoenix Rising” Pathway to Promote Wound Healing and Tissue Regeneration. *Sci Signal* *3*, ra13.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., and Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* *94*, 491–501.
- Liao, W.C., Haimovitz-Friedman, A., Persaud, R.S., McLoughlin, M., Ehleiter, D., Zhang, N., Gatei, M., Lavin, M., Kolesnick, R., and Fuks, Z. (1999). Ataxia telangiectasia-mutated gene product inhibits DNA damage-induced apoptosis via ceramide synthase. *J. Biol. Chem.* *274*, 17908–17917.
- Lin, T., Genestier, L., Pinkoski, M.J., Castro, A., Nicholas, S., Mogil, R., Paris, F., Fuks, Z., Schuchman, E.H., Kolesnick, R.N., et al. (2000). Role of acidic sphingomyelinase in Fas/CD95-mediated cell death. *J. Biol. Chem.* *275*, 8657–8663.
- Lindsay, J., Esposti, M.D., and Gilmore, A.P. (2011). Bcl-2 proteins and mitochondria—Specificity in membrane targeting for death. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1813*, 532–539.
- Lovell, J.F., Billen, L.P., Bindner, S., Shamas-Din, A., Fradin, C., Leber, B., and Andrews, D.W. (2008). Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax. *Cell* *135*, 1074–1084.
- Lucken-Ardjomande, S., Montessuit, S., and Martinou, J.-C. (2007). Bax activation and stress-induced apoptosis delayed by the accumulation of cholesterol in mitochondrial membranes. *Cell Death Differ.* *15*, 484–493.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* *94*, 481–490.
- Lüthi, A.U., and Martin, S.J. (2007). The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ.* *14*, 641–650.
- Lutter, M., Fang, M., Luo, X., Nishijima, M., Xie, X., and Wang, X. (2000). Cardiolipin provides specificity for targeting of tBid to mitochondria. *Nat. Cell Biol.* *2*, 754–761.
- Lutz, R.J. (2000). Role of the BH3 (Bcl-2 homology 3) domain in the regulation of apoptosis and Bcl-2-related proteins. *Biochem. Soc. Trans.* *28*, 51–56.
- Ma, S., Hockings, C., Anwari, K., Kratina, T., Fennell, S., Lazarou, M., Ryan, M.T., Kluck, R.M., and Dewson, G. (2013). Assembly of the Bak apoptotic pore: a critical role for the

Bak protein $\alpha 6$ helix in the multimerization of homodimers during apoptosis. *J. Biol. Chem.* *288*, 26027–26038.

Marani, M., Tenev, T., Hancock, D., Downward, J., and Lemoine, N.R. (2002). Identification of novel isoforms of the BH3 domain protein Bim which directly activate Bax to trigger apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 3577–3589.

Marcuzzi, A., Tricarico, P.M., Piscianz, E., Kleiner, G., Brumatti, L.V., and Crovella, S. (2013). Lovastatin induces apoptosis through the mitochondrial pathway in an undifferentiated SH-SY5Y neuroblastoma cell line. *Cell Death Dis.* *4*, e585.

Martin, L.J., Lau, E., Singh, H., Vergnes, L., Tarling, E.J., Mehrabian, M., Mungrue, I., Xiao, S., Shih, D., Castellani, L., et al. (2012). ABCC6 localizes to the mitochondria-associated membrane. *Circ. Res.* *111*, 516–520.

Martínez-Abundis, E., Correa, F., Pavón, N., and Zazueta, C. (2009). Bax distribution into mitochondrial detergent-resistant microdomains is related to ceramide and cholesterol content in postischemic hearts. *FEBS J.* *276*, 5579–5588.

Martínez-Abundis, E., Correa, F., Rodríguez, E., Soria-Castro, E., Rodríguez-Zavala, J.S., Pacheco-Alvarez, D., and Zazueta, C. (2011). A CRAC-like motif in BAX sequence: relationship with protein insertion and pore activity in liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* *1808*, 1888–1895.

Marzo, I., Brenner, C., and Kroemer, G. (1998). The central role of the mitochondrial megachannel in apoptosis: evidence obtained with intact cells, isolated mitochondria, and purified protein complexes. *Biomed. Pharmacother. Bioméd. Pharmacothérapie* *52*, 248–251.

Mathias, S., Peña, L.A., and Kolesnick, R.N. (1998). Signal transduction of stress via ceramide. *Biochem. J.* *335*, 465.

McDonnell, T.J., Deane, N., Platt, F.M., Nunez, G., Jaeger, U., McKearn, J.P., and Korsmeyer, S.J. (1989). *bcl-2*-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* *57*, 79–88.

McIlwain, D.R., Berger, T., and Mak, T.W. (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *5*, a008656.

Mesmin, B., and Maxfield, F.R. (2009). Intracellular sterol dynamics. *Biochim. Biophys. Acta* *1791*, 636–645.

Mignard, V., Lalier, L., Paris, F., and Vallette, F.M. (2014). Bioactive lipids and the control of Bax pro-apoptotic activity. *Cell Death Dis.* *5*, e1266.

Mikhailov, V., Mikhailova, M., Pulkrabek, D.J., Dong, Z., Venkatachalam, M.A., and Saikumar, P. (2001). *Bcl-2* prevents Bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane. *J. Biol. Chem.* *276*, 18361–18374.

- Miller, W.L., and Bose, H.S. (2011). Early Steps in Steroidogenesis: Intracellular Cholesterol Trafficking Thematic Review Series: Genetics of Human Lipid Diseases. *J. Lipid Res.* *52*, 2111–2135.
- Moldoveanu, T., Follis, A.V., Kriwacki, R.W., and Green, D.R. (2014). Many players in BCL-2 family affairs. *Trends Biochem. Sci.* *39*, 101–111.
- Montero, J., Morales, A., Llacuna, L., Lluís, J.M., Terrones, O., Basañez, G., Antonsson, B., Prieto, J., García-Ruiz, C., Colell, A., et al. (2008). Mitochondrial cholesterol contributes to chemotherapy resistance in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* *68*, 5246–5256.
- Montisano, D.F., Cascarano, J., Pickett, C.B., and James, T.W. (1982). Association between mitochondria and rough endoplasmic reticulum in rat liver. *Anat. Rec.* *203*, 441–450.
- Motz, C., Martin, H., Krimmer, T., and Rassow, J. (2002). Bcl-2 and porin follow different pathways of TOM-dependent insertion into the mitochondrial outer membrane. *J. Mol. Biol.* *323*, 729–738.
- Muchmore, S.W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Yoon, H.S., Nettesheim, D., Chang, B.S., Thompson, C.B., Wong, S.L., et al. (1996). X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* *381*, 335–341.
- Mullen, T.D., Hannun, Y.A., and Obeid, L.M. (2012). Ceramide synthases at the centre of sphingolipid metabolism and biology. *Biochem. J.* *441*, 789–802.
- Muppidi, J.R., Lobito, A.A., Ramaswamy, M., Yang, J.K., Wang, L., Wu, H., and Siegel, R.M. (2006). Homotypic FADD interactions through a conserved RXDLL motif are required for death receptor-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* *13*, 1641–1650.
- Nagata, S. (2000). Apoptotic DNA fragmentation. *Exp. Cell Res.* *256*, 12–18.
- Nakano, K., and Vousden, K.H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol. Cell* *7*, 683–694.
- Narita, M., Shimizu, S., Ito, T., Chittenden, T., Lutz, R.J., Matsuda, H., and Tsujimoto, Y. (1998). Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 14681–14686.
- Neupert, W., and Herrmann, J.M. (2007). Translocation of proteins into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* *76*, 723–749.
- Nijhawan, D., Honarpour, N., and Wang, X. (2000). Apoptosis in neural development and disease. *Annu. Rev. Neurosci.* *23*, 73–87.
- Nomura, K., Imai, H., Koumura, T., Kobayashi, T., and Nakagawa, Y. (2000). Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia-induced apoptosis. *Biochem. J.* *351*, 183–193.

Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., and Tanaka, N. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288, 1053–1058.

Ogretmen, B., and Hannun, Y.A. (2004). Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat. Rev. Cancer* 4, 604–616.

Olivera, A., and Spiegel, S. (1993). Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature* 365, 557–560.

Olivera, A., Kohama, T., Edsall, L., Nava, V., Cuvillier, O., Poulton, S., and Spiegel, S. (1999). Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival. *J. Cell Biol.* 147, 545–558.

Opferman, J.T., and Korsmeyer, S.J. (2003). Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat. Immunol.* 4, 410–415.

Ott, M., Robertson, J.D., Gogvadze, V., Zhivotovsky, B., and Orrenius, S. (2002). Cytochrome C Release from Mitochondria Proceeds by a Two-Step Process. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 1259–1263.

Paris, F., Fuks, Z., Kang, A., Capodiceci, P., Juan, G., Ehleiter, D., Haimovitz-Friedman, A., Cordon-Cardo, C., and Kolesnick, R. (2001). Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science* 293, 293–297.

Perry, D.K., Carton, J., Shah, A.K., Meredith, F., Uhlinger, D.J., and Hannun, Y.A. (2000). Serine palmitoyltransferase regulates de novo ceramide generation during etoposide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 275, 9078–9084.

Petit, E., Oliver, L., and Vallette, F.M. (2009). The mitochondrial outer membrane protein import machinery: a new player in apoptosis? *Front. Biosci. Landmark Ed.* 14, 3563–3570.

Pickett, C.B., Montisano, D., Eisner, D., and Cascarano, J. (1980). The physical association between rat liver mitochondria and rough endoplasmic reticulum. I. Isolation, electron microscopic examination and sedimentation equilibrium centrifugation analyses of rough endoplasmic reticulum-mitochondrial complexes. *Exp. Cell Res.* 128, 343–352.

Portanova et al. (1996). Selective neutralization of prostaglandin E2 blocks inflammation, hyperalgesia, and interleukin 6 production in vivo. *J. Exp. Med.* 184, 883–891.

Puthalakath, H., and Strasser, A. (2002). Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ.* 9, 505–512.

Puthalakath, H., O'Reilly, L.A., Gunn, P., Lee, L., Kelly, P.N., Huntington, N.D., Hughes, P.D., Michalak, E.M., McKimm-Breschkin, J., Motoyama, N., et al. (2007). ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* 129, 1337–1349.

- Rao, L., Perez, D., and White, E. (1996). Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J. Cell Biol.* *135*, 1441–1455.
- Reynolds, C.P., Maurer, B.J., and Kolesnick, R.N. (2004). Ceramide synthesis and metabolism as a target for cancer therapy. *Cancer Lett.* *206*, 169–180.
- Riedl, S.J., and Shi, Y. (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 897–907.
- Rizzuto, R., Brini, M., Murgia, M., and Pozzan, T. (1993). Microdomains with high Ca²⁺ close to IP₃-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science* *262*, 744–747.
- Rotolo, J.A., Maj, J.G., Feldman, R., Ren, D., Haimovitz-Friedman, A., Cordon-Cardo, C., Cheng, E.H.-Y., Kolesnick, R., and Fuks, Z. (2008). Bax and Bak do not exhibit functional redundancy in mediating radiation-induced endothelial apoptosis in the intestinal mucosa. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *70*, 804–815.
- Rowland, A.A., and Voeltz, G.K. (2012). Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: function of the junction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 607–625.
- Rundhaug, J.E., Simper, M.S., Surh, I., and Fischer, S.M. (2011). The role of the EP receptors for prostaglandin E₂ in skin and skin cancer. *Cancer Metastasis Rev.* *30*, 465–480.
- Rusiñol, A.E., Cui, Z., Chen, M.H., and Vance, J.E. (1994). A unique mitochondria-associated membrane fraction from rat liver has a high capacity for lipid synthesis and contains pre-Golgi secretory proteins including nascent lipoproteins. *J. Biol. Chem.* *269*, 27494–27502.
- Saito, M., Korsmeyer, S.J., and Schlesinger, P.H. (2000). BAX-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. *Nat. Cell Biol.* *2*, 553–555.
- Sani, M.-A., Dufourc, E.J., and Gröbner, G. (2009). How does the Bax- α 1 targeting sequence interact with mitochondrial membranes? The role of cardiolipin. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *1788*, 623–631.
- Sano, R., Annunziata, I., Patterson, A., Moshiach, S., Gomero, E., Opferman, J., Forte, M., and d' Azzo, A. (2009). GM1-ganglioside accumulation at the mitochondria-associated ER membranes links ER stress to Ca²⁺-dependent mitochondrial apoptosis. *Mol. Cell* *36*, 500–511.
- Sarosiek, K.A., Chi, X., Bachman, J.A., Sims, J.J., Montero, J., Patel, L., Flanagan, A., Andrews, D.W., Sorger, P., and Letai, A. (2013a). BID Preferentially Activates BAK while BIM Preferentially Activates BAX, Affecting Chemotherapy Response. *Mol. Cell* *51*, 751–765.
- Sarosiek, K.A., Ni Chonghaile, T., and Letai, A. (2013b). Mitochondria: gatekeepers of response to chemotherapy. *Trends Cell Biol.* *23*, 612–619.
- Scarf, A.M., and Kassiou, M. (2011). The Translocator Protein. *J. Nucl. Med.* *52*, 677–680.

- Schafer, B., Quispe, J., Choudhary, V., Chipuk, J.E., Ajero, T.G., Du, H., Schneider, R., and Kuwana, T. (2009). Mitochondrial outer membrane proteins assist Bid in Bax-mediated lipidic pore formation. *Mol. Biol. Cell* *20*, 2276–2285.
- Schendel, S.L., Xie, Z., Montal, M.O., Matsuyama, S., Montal, M., and Reed, J.C. (1997). Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 5113–5118.
- Schleiff, E., Shore, G.C., and Goping, I.S. (1997). Human mitochondrial import receptor, Tom20p. Use of glutathione to reveal specific interactions between Tom20-glutathione S-transferase and mitochondrial precursor proteins. *FEBS Lett.* *404*, 314–318.
- Schug, Z.T., and Gottlieb, E. (2009). Cardiolipin acts as a mitochondrial signalling platform to launch apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* *1788*, 2022–2031.
- Scott, F.L., Stec, B., Pop, C., Dobaczewska, M.K., Lee, J.J., Monosov, E., Robinson, H., Salvesen, G.S., Schwarzenbacher, R., and Riedl, S.J. (2009). The Fas-FADD death domain complex structure unravels signalling by receptor clustering. *Nature* *457*, 1019–1022.
- Sebastián, D., Hernández-Alvarez, M.I., Segalés, J., Sorianello, E., Muñoz, J.P., Sala, D., Waget, A., Liesa, M., Paz, J.C., Gopalacharyulu, P., et al. (2012). Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 5523–5528.
- Shimizu, S., Narita, M., and Tsujimoto, Y. (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* *399*, 483–487.
- Simmen, T., Aslan, J.E., Blagoveshchenskaya, A.D., Thomas, L., Wan, L., Xiang, Y., Feliciangeli, S.F., Hung, C.-H., Crump, C.M., and Thomas, G. (2005). PACS-2 controls endoplasmic reticulum-mitochondria communication and Bid-mediated apoptosis. *EMBO J.* *24*, 717–729.
- Siskind, L.J., and Colombini, M. (2000). The lipids C2- and C16-ceramide form large stable channels. Implications for apoptosis. *J. Biol. Chem.* *275*, 38640–38644.
- Siskind, L.J., Kolesnick, R.N., and Colombini, M. (2002). Ceramide Channels Increase the Permeability of the Mitochondrial Outer Membrane to Small Proteins. *J. Biol. Chem.* *277*, 26796–26803.
- Siskind, L.J., Davoody, A., Lewin, N., Marshall, S., and Colombini, M. (2003). Enlargement and Contracture of C2-Ceramide Channels. *Biophys. J.* *85*, 1560–1575.
- Siskind, L.J., Kolesnick, R.N., and Colombini, M. (2006). Ceramide forms channels in mitochondrial outer membranes at physiologically relevant concentrations. *Mitochondrion* *6*, 118–125.
- Siskind, L.J., Feinstein, L., Yu, T., Davis, J.S., Jones, D., Choi, J., Zuckerman, J.E., Tan, W., Hill, R.B., Hardwick, J.M., et al. (2008). Anti-apoptotic Bcl-2 Family Proteins Disassemble Ceramide Channels. *J. Biol. Chem.* *283*, 6622–6630.

- Siskind, L.J., Mullen, T.D., Romero Rosales, K., Clarke, C.J., Hernandez-Corbacho, M.J., Edinger, A.L., and Obeid, L.M. (2010). The BCL-2 protein BAK is required for long-chain ceramide generation during apoptosis. *J. Biol. Chem.* *285*, 11818–11826.
- Stiban, J., Fistere, D., and Colombini, M. (2006). Dihydroceramide hinders ceramide channel formation: Implications on apoptosis. *Apoptosis* *11*, 773–780.
- Stroud, D.A., Oeljeklaus, S., Wiese, S., Bohnert, M., Lewandrowski, U., Sickmann, A., Guiard, B., van der Laan, M., Warscheid, B., and Wiedemann, N. (2011). Composition and topology of the endoplasmic reticulum-mitochondria encounter structure. *J. Mol. Biol.* *413*, 743–750.
- Stupp, R., Hegi, M.E., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Taphoorn, M.J.B., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., et al. (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* *10*, 459–466.
- Sutendra, G., Dromparis, P., Wright, P., Bonnet, S., Haromy, A., Hao, Z., McMurtry, M.S., Michalak, M., Vance, J.E., Sessa, W.C., et al. (2011). The role of Nogo and the mitochondria-endoplasmic reticulum unit in pulmonary hypertension. *Sci. Transl. Med.* *3*, 88ra55.
- Szabatkai, G., Bianchi, K., Várnai, P., De Stefani, D., Wieckowski, M.R., Cavagna, D., Nagy, A.I., Balla, T., and Rizzuto, R. (2006). Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. *J. Cell Biol.* *175*, 901–911.
- Tabasinezhad, M., Samadi, N., Ghanbari, P., Mohseni, M., Saei, A.A., Sharifi, S., Saeedi, N., and Pourhassan, A. (2013). Sphingosin 1-phosphate contributes in tumor progression. *J. Cancer Res. Ther.* *9*, 556–563.
- Taha, T.A., Mullen, T.D., and Obeid, L.M. (2006a). A house divided: ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate in programmed cell death. *Biochim. Biophys. Acta* *1758*, 2027–2036.
- Taha, T.A., Kitatani, K., El-Alwani, M., Bielawski, J., Hannun, Y.A., and Obeid, L.M. (2006b). Loss of sphingosine kinase-1 activates the intrinsic pathway of programmed cell death: modulation of sphingolipid levels and the induction of apoptosis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *20*, 482–484.
- Tang, D., Lahti, J.M., and Kidd, V.J. (2000). Caspase-8 activation and bid cleavage contribute to MCF7 cellular execution in a caspase-3-dependent manner during staurosporine-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* *275*, 9303–9307.
- Tartaglia, L.A., Ayres, T.M., Wong, G.H.W., and Goeddel, D.V. (1993). A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* *74*, 845–853.
- Taylor, R.C., Cullen, S.P., and Martin, S.J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 231–241.

- Tsujimoto, Y., and Shimizu, S. (2002). The voltage-dependent anion channel: an essential player in apoptosis. *Biochimie* 84, 187–193.
- Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E., and Croce, C.M. (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228, 1440–1443.
- Tubbs, E., Theurey, P., Vial, G., Bendridi, N., Bravard, A., Chauvin, M.-A., Ji-Cao, J., Zoulim, F., Bartosch, B., Ovize, M., et al. (2014). Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membrane (MAM) Integrity Is Required for Insulin Signaling and Is Implicated in Hepatic Insulin Resistance. *Diabetes* 63, 3279–3294.
- Vance, J.E. (1990). Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *J. Biol. Chem.* 265, 7248–7256.
- Vance, J.E. (2014). MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: lipids and beyond. *Biochim. Biophys. Acta* 1841, 595–609.
- Vance, J.E., Stone, S.J., and Faust, J.R. (1997). Abnormalities in mitochondria-associated membranes and phospholipid biosynthetic enzymes in the mnd/mnd mouse model of neuronal ceroid lipofuscinosis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab.* 1344, 286–299.
- Vane, J.R. (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature. New Biol.* 231, 232–235.
- De Vos, K.J., Mórotz, G.M., Stoica, R., Tudor, E.L., Lau, K.-F., Ackerley, S., Warley, A., Shaw, C.E., and Miller, C.C.J. (2012). VAPB interacts with the mitochondrial protein PTPIP51 to regulate calcium homeostasis. *Hum. Mol. Genet.* 21, 1299–1311.
- Wang, D., and DuBois, R.N. (2006). Prostaglandins and cancer. *Gut* 55, 115–122.
- Wang, X., and Schwarz, T.L. (2009). The mechanism of Ca²⁺ -dependent regulation of kinesin-mediated mitochondrial motility. *Cell* 136, 163–174.
- Wang, N.S., Unkila, M.T., Reineks, E.Z., and Distelhorst, C.W. (2001). Transient expression of wild-type or mitochondrially targeted Bcl-2 induces apoptosis, whereas transient expression of endoplasmic reticulum-targeted Bcl-2 is protective against Bax-induced cell death. *J. Biol. Chem.* 276, 44117–44128.
- Wang, X., Su, B., Lee, H., Li, X., Perry, G., Smith, M.A., and Zhu, X. (2009). Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 9090–9103.
- Wang, X., Winter, D., Ashrafi, G., Schlehe, J., Wong, Y.L., Selkoe, D., Rice, S., Steen, J., LaVoie, M.J., and Schwarz, T.L. (2011). PINK1 and Parkin target Miro for phosphorylation and degradation to arrest mitochondrial motility. *Cell* 147, 893–906.
- Wasiak, S., Zunino, R., and McBride, H.M. (2007). Bax/Bak promote sumoylation of DRP1 and its stable association with mitochondria during apoptotic cell death. *J. Cell Biol.* 177, 439–450.

Wei, M.C., Lindsten, T., Mootha, V.K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. (2000). tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev.* *14*, 2060–2071.

Wieckowski, M.R., Giorgi, C., Lebiedzinska, M., Duszynski, J., and Pinton, P. (2009). Isolation of mitochondria-associated membranes and mitochondria from animal tissues and cells. *Nat. Protoc.* *4*, 1582–1590.

Williamson, C.D., and Colberg-Poley, A.M. (2009). Access of viral proteins to mitochondria via mitochondria-associated membranes. *Rev. Med. Virol.* *19*, 147–164.

Williamson, C.D., Zhang, A., and Colberg-Poley, A.M. (2011). The human cytomegalovirus protein UL37 exon 1 associates with internal lipid rafts. *J. Virol.* *85*, 2100–2111.

Wu, B.X., Rajagopalan, V., Roddy, P.L., Clarke, C.J., and Hannun, Y.A. (2010). Identification and characterization of murine mitochondria-associated neutral sphingomyelinase (MA-nSMase), the mammalian sphingomyelin phosphodiesterase 5. *J. Biol. Chem.* *285*, 17993–18002.

Xia, P., Wang, L., Gamble, J.R., and Vadas, M.A. (1999). Activation of sphingosine kinase by tumor necrosis factor- α inhibits apoptosis in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* *274*, 34499–34505.

Yamaji, T., Kumagai, K., Tomishige, N., and Hanada, K. (2008). Two sphingolipid transfer proteins, CERT and FAPP2: their roles in sphingolipid metabolism. *IUBMB Life* *60*, 511–518.

Yamashita, H., Kitayama, J., Shida, D., Yamaguchi, H., Mori, K., Osada, M., Aoki, S., Yatomi, Y., Takuwa, Y., and Nagawa, H. (2006). Sphingosine 1-phosphate receptor expression profile in human gastric cancer cells: differential regulation on the migration and proliferation. *J. Surg. Res.* *130*, 80–87.

Yin, X.M., Oltvai, Z.N., and Korsmeyer, S.J. (1994). BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* *369*, 321–323.

Youle, R.J., and van der Bliek, A.M. (2012). Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science* *337*, 1062–1065.

Young, N., and Van Brocklyn, J.R. (2006). Signal Transduction of Sphingosine-1-Phosphate G Protein—Coupled Receptors. *ScientificWorldJournal* *6*, 946–966.

Yu, W., Sun, Y., Guo, S., and Lu, B. (2011). The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial dynamics and function in mammalian hippocampal and dopaminergic neurons. *Hum. Mol. Genet.* *20*, 3227–3240.

Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Hirsch, T., Susin, S.A., Mase, B., and Kroemer, G. (1996). Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis. *FEBS Lett.* *384*, 53–57.

Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., and Korsmeyer, S.J. (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 87, 619–628.

Zhai, D., Miao, Q., Xin, X., and Yang, F. (2001). Leakage and aggregation of phospholipid vesicles induced by the BH3-only Bcl-2 family member, BID. *Eur. J. Biochem. FEBS* 268, 48–55.

Zhang, J., Alter, N., Reed, J.C., Borner, C., Obeid, L.M., and Hannun, Y.A. (1996). Bcl-2 interrupts the ceramide-mediated pathway of cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 5325–5328.

Thèse de Doctorat

Résumé

L'étude de l'apoptose est importante pour développer de nouvelles stratégies anti-cancéreuses. La voie mitochondriale de l'apoptose est finement régulée par le réseau d'interaction des protéines de la famille Bcl-2. D'autres acteurs moléculaires participent à la régulation de l'apoptose et notamment une famille de lipides bioactifs : les sphingolipides. De plus, des études récentes permettent d'envisager que les interactions entre le réticulum endoplasmique (RE) et la mitochondrie (*via* une région spécifique du RE appelée MAM) interviennent également dans la régulation de l'apoptose.

Nous avons mis au point un protocole de fractionnement subcellulaire permettant de séparer une fraction mitochondriale, des mitochondries purifiées et les MAM, puis analysé les compositions protéiques et lipidiques de ces fractions (par WB et HPLC-MS). Nous avons ensuite comparé les compositions de ces fractions à l'état basal et en conditions apoptotiques.

Nos résultats montrent que l'induction de l'apoptose induit une redistribution des protéines de la famille Bcl-2 avec notamment la transduction de Bax au niveau des mitochondries et des MAM ainsi qu'une forte augmentation de l'expression de la protéine Bcl-2 au niveau des MAM. En ce qui concerne les profils lipidiques, l'induction de l'apoptose entraîne une augmentation du taux de céramide dans les mitochondries et une diminution du taux de sphingomyéline dans les MAM.

L'ensemble de nos résultats suggère que les MAM pourraient jouer un rôle important dans la localisation subcellulaire des protéines de la famille Bcl-2 au cours de l'apoptose, potentiellement *via* la synthèse et/ou le trafic des sphingolipides.

Mots clés

Apoptose, mitochondrie, sphingolipides, céramides, MAM

Abstract

The study of apoptosis is important to develop new anti-cancer strategies. The mitochondrial apoptotic pathway is tightly regulated by the interaction network of the Bcl-2 family proteins but other molecular actors are involved in the regulation of apoptosis, in particular, a family of bioactive lipids : sphingolipids. The recent studies have shown that the interactions between endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria (via a specific region of the ER called Mitochondria associated membrane, MAM) are also involved in the regulation of apoptosis.

We have developed a subcellular fractionation protocol for the isolation of mitochondria fraction, purified mitochondria and MAM. The proteic and lipidic compositions of these fractions were analyzed by WB and HPLC-MS. We compared the compositions of subcellular fractions at normal and apoptotic conditions.

Our results show that induction of apoptosis causes the redistribution of the Bcl-2 family proteins including Bax transduction to mitochondria and MAM and an important increase of Bcl-2 expression at MAM

Regarding lipid profiles, inductions of apoptosis increases ceramide level at mitochondria and decreases sphingomyelin in the MAM fraction.

Taken together, these results may suggest that the MAM could play an important role in the subcellular localization of Bcl-2 family proteins during apoptosis, potentially through synthesis and/or trafficking of sphingolipids.

Key Words

Apoptosis, mitochondria, sphingolipids, ceramide, MAM