UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

Identification de nouveaux récepteurs mitochondriaux impliqués dans l'association des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak avec la membrane externe au cours de l'apoptose ; mise en évidence d'un nouveau système de régulation

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale CHIMIE-BIOLOGIE

présentée

et soutenue publiquement par

BELLOT Grégory

Le 29 novembre 2006, devant le jury ci-dessous

Président	**Yannick Jacques**
Rapporteurs	**Bernard Mignotte**
	Olivier Coqueret
Examinateurs	**Michel Toledano**
	Jean-Pierre Henry

Directeur de thèse ; Mr François VALLETTE

Résumé

La voie mitochondriale de l'apoptose est régulée par les protéines de la famille de Bcl-2. Bax et Bak induisent la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale et la libération de facteurs apoptogéniques comme le cytochrome c. Cependant les mécanismes moléculaires impliqués dans les étapes précoces du mécanisme d'action de Bax et de Bak restent mal connus. Les travaux présentés ici montrent l'existence de récepteurs mitochondriaux directement impliqués dans les fonctions de Bax et de Bak. Tom22 est le récepteur de Bax impliqué dans l'association de celui-ci à la mitochondrie lors de l'apoptose. La metaxine 2 puis la metaxine 1 interagissent avec Bak respectivement en conditions normales et apoptotiques. L'identification de ces partenaires mitochondriaux des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak permet de relier la machinerie d'importation des protéines de la membrane externe à la régulation des fonctions de ces protéines.

Mots clés: Apopotose, Bax, Bak, mitochondries, complexes protéiques, perméabilisation, machinerie d'importation

Abstract

The Bcl-2 family of proteins regulates the mitochondrial pathway of apoptosis. Bax and Bak induce the permeabilization of the outer membrane and release of apoptogenic factors such as cytochrome c. However the early molecular events involved in Bax/Bak-induced permeabilization remain poorly understood. Here we have identified the mitochondrial receptors directly implicated in Bax/Bak functions. Tom22 is the receptor of Bax and is involved in Bax association with mitochondria during apoptosis. Metaxin 2 and metaxin 1 interact with Bak respectively in healthy condition and in apoptotic condition. The identification of these new mitochondrial partners of Bax and Bak represents a link between the import machinery of the mitochondrial outer membrane and the regulation of Bax/Bak functions.

Key words: Apoptosis, Bax, Bak, mitochondria, protein complexes, permeabilization, import machinery

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 5
A. Généralités 2
B. Libération de facteurs apoptogéniques par la mitochondrie au cours de l'apoptose 5
1. Le cytochrome c 5
2. Smac/DIABLO 6
3. L'AIF (Apoptosis Inducing Factor) 7
4. L'endonucléase G 8
5. HtrA2/OMI 8
6. DDP/TIMM8a 9
7. Autres facteurs apoptogéniques mitochondriaux 10
C. Régulation de la voie mitochondriale de l'apoptose par les protéines de la famille de Bcl-2 16
1. Les protéines de la famille de Bcl-2 16
2. Relation entre la structure et la fonction des protéines de la famille de Bcl-2 17
3. Régulation de la perméabilité mitochondriale par les protéines de la famille de Bcl-2 au cours de l'apoptose 19
D. Dynamique de la morphologie mitochondriale au cours de l'apoptose 24
1. Régulation de la morphologie mitochondriale 25
2. L'apoptose et la fragmentation mitochondriale 28
E. Importation des protéines dans la mitochondrie 30
1. Adressage des protéines mitochondriales 31
2. Translocation des protéines de la membrane externe : le complexe TOM 31
3. Assemblage des protéines dans la membrane externe : le complexe SAM 33
F. Problématique 35
MATERIEL ET METHODES 36
A. BIOLOGIE MOLECULAIRE 37
1. Construction des vecteurs d'expression de siRNA 37
2. Transformation de bactéries 37
3. Production de plasmides 38
4. Vérification des plasmides par digestion de restriction 38
B. CULTURE CELLULAIRE 38
1. Cellules 38
2. Transfection 39
3. Sélection des cellules transfectées 40
4. Induction de l'apoptose 40
C. Techniques d'isolation de mitochondries 40
1. Fractionnement subcellulaire 40
2. Purification de mitochondries de foie de rat BDIX 41
D. BIOCHIMIE 41
1. Extraction de protéines 41
2. Electrophorèse et western blot 42
3. Analyse des complexes mitochondriaux par gel 2D 43
4. Immunoprécipitations 45
5. Cross-linking 46
6. Peptide Scan 46
7. Tests acellulaires sur mitochondries isolées 47
8. Mesure d'activité DEVDase 48
9. Transcription/traduction in vitro de plasmides 48
10. Purification de protéines His-taggées 49
11. Activation de Bax recombinant His-taggé par le pH et séparation des fractions monomériques et oligomériques 50
12. Activation de protéines de la famille de Bcl-2 par la chaleur 50

13. Formation de complexes in vitro entre différentes protéines radiomarquées 50
RESULTATS ET DISCUSSIONS p.60 51
CHAPITRE i : Etapes précoces de l'association de la protéine effectrice pro-apoptotique Bax avec la membrane externe de la mitochondrie: mise en évidence d'un récepteur mitochondrial de Bax 53
A. Avant-propos.....54
B. Article : mise en évidence de Tom22, un récepteur appartenant au pore de translocation de la membrane externe mitochondriale, en tant que récepteur de la protéine pro-apoptotique Bax 56
C. Commentaires et résultats complémentaires 65
D. Mise en évidence de complexes protéiques mitochondriaux contenant Bax 69
E. Modèle d'association de Bax avec la mitochondrie au cours du processus apoptotique 78
CHAPITRE II.....80
A. Avant-propos.....82
B. Article : Le MAC correspond à un événement tardif au cours de l'apoptose.....83
C. Commentaires et résultats complémentaires 84
CHAPITRE III.....87
A. Avant-propos.....88
B. Mise en évidence de nouveaux partenaires mitochondriaux de Bak 90
C. Implications fonctionnelles de l'interaction de Bak avec les metaxines 96
D. Mise en évidence des complexes mitochondriaux contenant Bak et les Metaxines 104
E. Modèle du mécanisme des interactions Bak/metaxines 1 et 2 105
CONCLUSION 108
BIBLIOGRAPHIE.....110
ANNEXE 137

TABLES DES TABLEAUX ET FIGURES

TABLEAUX

MATERIEL ET METHODES

Tableau 1: Lignées cellulaires utilisées au cours de ce travail p.45

Tableau 2: Liste des principaux anticorps utilisés au cours de ce travail p.50

FIGURES

INTRODUCTION

Figure 1: Représentation schématique des voies extrinsèques et intrinsèques de l'apoptose et de la cascade d'activation des caspases p.4

Figure 2: Différents rôles des facteurs apoptogéniques libérées par la mitochondrie au cours de l'apoptose p.12

Figure 3: Evènements de la voie mitochondriale de l'apoptose p.17

Figure 4: Les protéines de la famille de Bcl-2 p.19

Figure 5: Schéma simplifié du processus de fission mitochondriale p.30

Figure 6: Schéma représentant l'étape de docking de deux mitochondries adjacentes mécanisme de fusion

Figure 7: La machinerie d'importation de la membrane externe mitochondriale p.38

RESULTATS ET DISCUSSIONS

CHAPITRE I: *Etapes précoces de l'association de la protéine effectrice pro-apoptotique Bax avec la membrane externe de la mitochondrie: mise en évidence d'un récepteur mitochondrial de Bax*

Figure 1: Diminution de l'expression de Tom22 par siRNA dans des cellules HeLa p.65

Figure 2: Epitope mapping p.68

Figure 3: Etude du potentiel de perméabilisation de fractions monomériques ou oligomériques de Bax activé à pH 6,0 sur mitochondries isolées de foie de rat p.70

Figure 4: Caractérisation des complexes protéiques mitochondriaux formés par Bax suite à sa translocation dans la membrane externe p.72

Figure 5: Identification des complexes mitochondriaux contenant Tom40 et mise en évidence de complexes formés par du Bax pré-activé au triton X100 p.75

Figure 6: Analyse par gels 2D réalisés à partir de mitochondries de cellules HeLa traitées à la staurosporine p.77

Figure 7: Modèle relatant le mode d'action de Bax p.80

CHAPITRE II: *Perméabilité mitochondriale au cours de l'apoptose*

Figure 1: Analyse par cross-linking de l'évolution des protéines VDAC et Tom40 au sein d fractions p.85

Figure 2: Analyse par cross-linking de l'oligomérisation de Bak p.86

CHAPITRE III: *Association de Bak à la mitochondrie: mise en évidence de nouveaux partenaires protéiques et mécanisme moléculaire de la mort induite par Bak*

Figure 1: Régulation de Bak sur la membrane externe de la mitochondrie p.91

Figure 2: Association de Bak radiomarqué sur des mitochondries isolées de foie de rat pré-incubées avec des anticorps ciblant diverses protéines de la membrane externe p.92

Figure 3: association de Bak et des ses formes délétées ou mutées sur des mitochondries de GBM déficientes en Bax et en Bak p.94

Figure 4: Eutde fonctionnelle de l'interaction de Bak avec les metaxines dans les modèles GBM AS-Mtx2 et GBM AS-Mtx1 p.99

Figure 5: Diminution de l'expression de la metaxine 1 par expression de shRNA dans deux autres modèles cellulaires. p.101

Figure 6: Effet de la surexpression de la Mtx1ΔTm/C dans des cellules de glioblastomes déficientes en Bax p.103

Figure 7: Effet de la compétition induite par ajout de Mtx1 ΔTm/C sur l'association de Bak activé ou non p.105

Figure 8: Analyse par gels 2D des complexes mitochondriaux contenant Bax et les metaxines en conditions contrôles ou apoptotiques p.106

Figure 9: Modèles du mécanisme de perméabilisation induit par Bak p.109

INTRODUCTION

A. GENERALITES

L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire très conservé au sein de tous les organismes multicellulaires. Ce processus est impliqué dans tous les stages du développement d'un individu et reste essentiel dans sa vie adulte. Ce type de mort cellulaire se déroulant à un instant donné et en une localisation précise au cours du développement a été nommé mort cellulaire programmée illustrant ainsi la notion d'un mécanisme mis en place par les cellules elles-mêmes afin d'induire leur propre mort. Ainsi, la mort cellulaire par apoptose s'inscrit en tant que réponse physiologique d'une cellule cible à un stimulus donné et s'oppose ainsi à une mort cellulaire par nécrose qui est le résultat de traumatismes violents comme une lésion tissulaire et qui atteint des populations entières de cellules.

Depuis la première description des changements de morphologie cellulaire au cours de l'apoptose incluant une perte d'intégrité de la membrane plasmique avec exposition de phosphatidylsérine permettant le recrutement des macrophages, une condensation nucléaire, une

contraction cellulaire et un bourgeonnement cellulaire (ou « blebbing »), le rôle de ce processus de mort ainsi que les évènements moléculaires se déroulant au cours de l'apoptose ont été très largement étudié (**Kerr *et al.*, 1972**) (**Vaux & Korsmeyer, 1999**). Il faut noter que l'ensemble de ces changements morphologiques observés conduit à la phagocytose des corps apoptotiques ainsi formés par des macrophages évitant ainsi le déversement du contenu cellulaire et l'inflammation du tissu environnant caractéristique de la mort par nécrose.

Ainsi le processus apoptotique est un mécanisme encodé génétiquement jouant un rôle crucial dans l'embryogenèse, dans la préservation de l'homéostasie des tissues et dans l'élimination des cellules endommagées ou non souhaitées (**Vaux & Korsmeyer, 1999**). D'un point de vue physiopathologique la dérégulation des voies de signalisation de ce mécanisme conduisant à un excès ou une carence en apoptose est impliquée dans bon nombre de pathologies. Parmi ces pathologies se trouvent des maladies auto-immunes et des problèmes d'immunodéficience, des maladies neurodégénératives (comme la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington, la maladie d'Alzheimer et la sclérose latérale amyotrophique) et également les cancers.

Les voies de signalisation apoptotiques sont sous le contrôle d'une famille de protéines appelées caspases. Les caspases sont une famille de protéases à cystéine clivant leur substrat après un résidu aspartate (**Nicholson, 1999**). A ce jour douze caspases humaines ont été identifiées: les caspases 1 à 10, la caspase 12 et la caspase 14 (**Oliver & Vallette, 2005**). Elles peuvent être groupées selon leur fonction. Le premier groupe intervient dans la maturation des cytokines et comprend les caspases 1, 4, 5 et 10 (**Los *et al.*, 2003**). Le second groupe incluant les caspases 2, 3, 6, 7, 8, 9 et 12 est chargé d'exécuter le programme apoptotique. Ce dernier groupe peut-être subdivisé en deux classes de caspases. Les caspases initiatrices (caspases 8 et 9) sont identifiables par un long prodomaine avec des motifs d'interaction protéine-protéine comme le **D**eath **E**ffector **D**omain (DED) ou le **Ca**spase **R**ecuitment **D**omain (CARD) impliqués dans la transduction de différents signaux induisant leur activité protéolytique responsable de l'activation des caspases effectrices (caspases 2, 3, 6 et 7) caractérisées par un court prodomaine et un manque d'activité enzymatique intrinsèque d'où la nécessité d'une activation par les caspases initiatrices (**Salvesen & Abrams, 2004**). Les caspases effectrices sont responsables du clivage de la plupart des substrats apoptotiques connus comme le DNA fragmentation factor 45, la poly-(ADP-ribose) polymérase ou acinus.

En ce qui concerne les caspases initiatrices elles agissent au travers de deux voies apoptotiques distinctes qui résultent toutes deux en l'activation des caspases effectrices (figure 1). La voie des récepteurs de mort ou voie extrinsèque est activée par liaison de ligands sur des récepteurs de type récepteurs de la famille du TNF (**T**umor **N**ecrosis **F**actor) et mène à l'activation de la caspase 8 (**Ashkenazi, 2002**). Une étude du groupe de Reed utilisant un système acellulaire a révélé également que l'apoptose nécessitait l'apport d'une fraction mitochondriale (**Newmeyer *et al.*, 1994**) impliquant ainsi l'existence d'une seconde voie de signalisation de l'apoptose. La voie mitochondriale ou voie intrinsèque initie l'activation de la caspase 9 au travers de la formation d'un complexe protéique appelé apoptosome. Cette voie est activée à la suite d'un certain nombre de stimuli comme

la privation en facteur de croissance, les UV, l'hypoxie, l'action de toxines…(**Nicholson, 1999**). L'ensemble de ces stimuli conduit à l'activation d'une famille de protéines, les protéines de la famille de Bcl-2, qui régulent cette voie mitochondriale de l'apoptose (**Antonsson, 2004**). La voie intrinsèque peut également agir en tant que boucle d'amplification de la voie extrinsèque de part la possibilité d'activation de la protéine Bid, une protéine de la famille de Bcl-2, par la caspase 8 (**Li *et al.*, 1998**).

Dans ce chapitre d'introduction l'accent sera mis principalement sur la voie intrinsèque et le rôle central de la mitochondrie dans l'apoptose. Le rôle crucial des protéines de la famille de Bcl-2 dans la régulation de cette voie, et dont est l'objet le travail qui sera présenté ensuite, y sera également explicité.

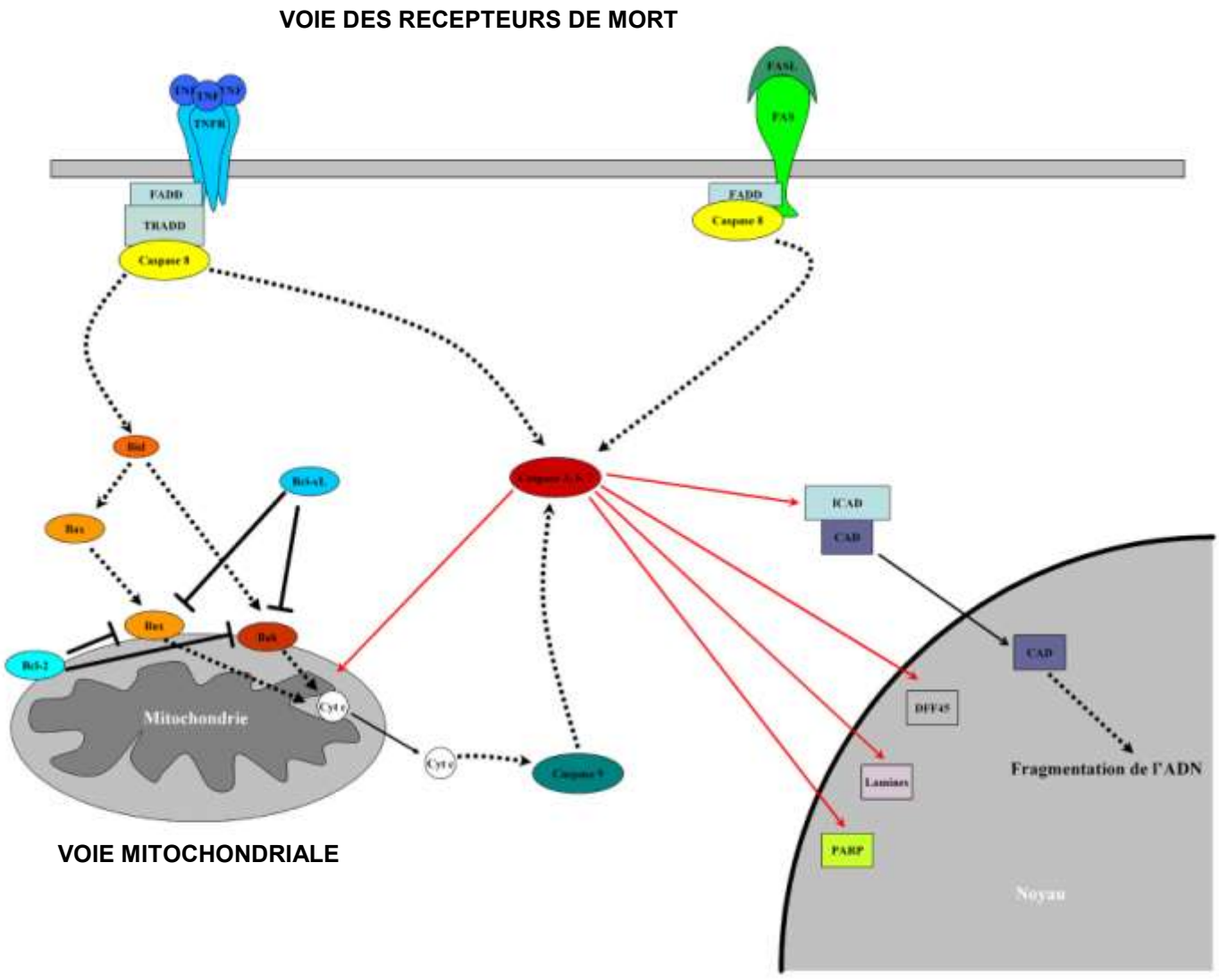


Figure 1: Représentation schématique des voies extrinsèques et intrinsèques de l'apoptose et de la cascade d'activation des caspases

B. LIBERATION DE FACTEURS APOPTOGENIQUES PAR LA MITOCHONDRIE AU COURS DE L'APOPTOSE

Un des points cruciaux se produisant au cours de la voie mitochondriale de l'apoptose correspond à la perte d'intégrité et à la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie. C'est ce mécanisme de perméabilisation qui est sous le contrôle la famille de Bcl-2 citée précédemment (**Kuwana & Newmeyer, 2003**). Cette étape de perméabilisation et sa régulation seront abordées dans les parties suivantes. Dans un premier temps il est important de savoir que la conséquence de cette augmentation de perméabilité mitochondriale est la libération de facteurs protéiques apoptogéniques contenus dans l'espace intermembranaire et qui ont la capacité de précipiter la mort cellulaire notamment en induisant l'activation des caspases (**Saelens *et al.*, 2004**). Ce sont ces différents facteurs apoptogéniques et leur rôle qui vont être décrits dans cette partie illustrant ainsi le rôle central que joue la mitochondrie dans le processus apoptotique.

1. Le cytochrome c

Le cytochrome c est, comme la plupart des protéines mitochondriales, le produit d'un gène nucléaire importé dans la mitochondrie sous la forme d'une apoprotéine via le complexe de translocation de la membrane externe ou complexe TOM dont nous reparlerons ultérieurement (**Diekert *et al.*, 2001**). Une fois dans l'espace intermembranaire cet apocytochrome c est converti en holocytochrome c fonctionnel sous l'action de la cytochrome c hème lyase. La fonction primaire de cette protéine est le transfert d'électron du complexe III vers le complexe IV de la chaîne respiratoire au cours de la phosphorylation oxydative.

C'est l'holocytochrome c qui fut la première protéine identifiée en tant que facteur libéré par la mitochondrie au cours de l'apoptose (**Liu *et al.*, 1996**). De plus cette relocalisation vers le cytosol, qui peut être inhibée par la protéine anti-apoptotique Bcl-2, induit l'activation des caspases (**Brustugun *et al.*, 1998**) (**Kluck *et al.*, 1997a**) (**Kluck *et al.*, 1997b**). Cette libération survient précocement dans l'étape de perméabilisation de la membrane externe. Il faut toutefois noter que le cytochrome c est libéré selon un processus en deux étapes (**Ott *et al.*, 2002**) dû à la manière dont il s'associe à la membrane interne mitochondriale. En effet il existe deux pools de cytochrome c liés à la membrane interne: un premier pool attaché faiblement à la membrane interne par des liaisons électrostatiques

avec des phospholipides anioniques, principalement la cardiolipine, et une seconde fraction fortement liée par le biais d'interactions hydrophobes induisant un « enfouissement » partiel de la protéine dans la membrane. Ainsi avant d'être libéré sous une forme soluble vers le cytosol le cytochrome c doit être mobilisé au préalable, c'est à dire que les liaisons de celui-ci avec la membrane interne doivent être abolies ce qui représente le premier stade du processus en deux temps décrit dans le travail de Ott *et al.* (**2002**). Cette mobilisation peut résulter, dans le cas de la fraction faiblement liée, de variations électrostatiques tel qu'une modification de pH ou de température alors que pour la fraction fortement liée ceci doit résulter de l'altération de la structure membranaire induite par une péroxydation lipidique par exemple.

Une fois présent dans le cytosol le cytochrome se lie à la protéine Apaf-1 (**A**poptotic **p**rotease **a**ctivating **f**actor-**1**) ce qui induit un changement de conformation dATP-dépendant aboutissant à l'oligomérisation d'Apaf-1 sous la forme d'un heptamère (**Jiang & Wang, 2000**). Ce complexe ainsi formé facilite le recrutement de la procaspase 9 au travers d'interactions homotypiques entre les domaines CARD et résulte ainsi dans la formation du complexe appelé apoptosome (**Hengartner, 2000**) (**Strasser *et al.*, 2000**). La formation de l'apoptosome aboutit à l'activation autoprotéolytique de la procaspase 9 qui ensuite active à son tour les caspases effectrices 3, 6 et 7 (**Li *et al.*, 1997**). De cette façon la mitochondrie par l'intermédiaire de la libération du cytochrome c participe directement à la cascade d'activation des caspases.

2. Smac/DIABLO

Smac/DIABLO (**S**econd **m**itochondrial **a**ctivator of **c**aspases/**D**irect **I**AP **B**inding protein of **Lo**w pI) fut la seconde protéine identifiée en tant que promoteur de l'activité caspase. Cependant contrairement au cytochrome c ce facteur n'agit pas en tant qu'activateur direct de l'activité caspase mais en antagonisant des inhibiteurs de caspases appelés IAPs pour **I**nhibitor of **A**poptosis **P**roteins (**Du *et al.*, 2000**) (**Verhagen *et al.*, 2000**).

a) Les IAPs

Afin de mieux comprendre l'impact du rôle de Smac dans le processus apoptotiques il est nécessaire de s'attarder un peu sur ces IAPs qui sont une famille conservée de protéines inhibant l'activité de certaines caspases (**Deveraux et al., 1998**) (**Deveraux & Reed, 1999**) (**Holcik & Korneluk, 2001**) (**Salvesen & Duckett, 2002**). Huit membres sont connus chez les mammifères incluant X-IAP (**X**-chromosome-linked **IAP**), NIAP (**N**euronal **IAP**), c-IAP1, c-IAP2, ILP-2 (**I**AP-**l**ike **p**rotein **2**), Bruce (**B**IR-**r**epeat-containing **u**biquitin-**c**onjugating **e**nzyme), survivin et ML-IAP/livin. Les cibles de ces protéines sont exclusivement les caspases 3, 7 et 9. Les IAPs sont généralement caractérisés par une répétition de trois motifs BIR (**B**aculoviral **I**AP **R**epeat), chacun de ces domaines semblant exhiber une fonction particulière. En effet le domaine BIR3 de X-IAP inhibe l'activité de la caspase 9 active alors que la région « linker » entre les domaines BIR1 et BIR2 inhibe les caspases 3 et 7 (**Shi, 2002**) (**Shiozaki *et al.*, 2003**). A contrario le domaine BIR unique de ML-IAP/livin inhibe les

caspases effectrices 3 et 7 (**Kasof & Gomes, 2001**) tandis que la survivin qui ne possède elle aussi qu'un seul domaine BIR n'inhibe aucune activité caspase *in vitro* mais semble jouer un rôle dans la mitose (**Altieri, 2001**). En outre les protéines X-IAP, c-IAP1 et c-IAP2 possède un domaine RING C-terminal présentant une activité ubiquitine ligase impliquée dans la dégradation des protéines cibles par le protéasome (**Jesenberger & Jentsch, 2002**) (**Saelens *et al.*, 2004**).

b) Rôle de Smac/DIABLO

En ce qui concerne la forme mature de Smac/DIABLO, elle contient une séquence N-terminale de quatre résidus (Ala-Val-Pro-Ile) qui forme un motif de liaison aux IAPs ou IBM (**I**AP **b**inding **m**otif). Smac est libéré sous forme de dimère dans le cytosol où il agit en tant que compétiteur des caspases pour la liaison aux IAPs avec lesquels il se lie au travers d'une interaction entre les domaines IBM et BIR (**Huang *et al.*, 2003**). Ceci aboutit donc à une potentialisation de l'activation des caspases par levée d'une inhibition dirigée contre celles-ci. Les IAPs via leur domaine RING peuvent induire ainsi la dégradation de Smac par le protéasome (**Hu & Yang, 2003**). Il existe des variants connus de Smac/DIABLO: Smac 3, similaire à Smac/DIABLO, qui se lie à XIAP puis induit sa dégradation par le protéasome au travers d'un mécanisme d'auto-ubiquitination (**Fu *et al.*, 2003**) et Smac β qui ne possède pas le signal d'adressage N-terminal et ne peut pas se lier aux IAPs mais qui possède tout de même une fonction pro-apoptotiques qui sensibilise à la mort cellulaire par apoptose suite à des stimulus de type ligand/récepteur de mort (**Roberts *et al.*, 2001**). A ce jour aucune fonction de Smac au niveau mitochondrial n'est connue, cependant sa fonction au cours de l'apoptose prévenant l'inhibition des caspases par les IAPs est essentielle pour permettre une activation optimale des caspases.

3. L'AIF (Apoptosis Inducing Factor)

Parmi les caractéristiques phénotypiques observées chez la cellule apoptotique se trouvent la condensation de la chromatine et la dégradation de l'ADN nucléaire par clivage internucléosomal. Les caspases effectrices sont en grande partie responsables de cette « apoptose nucléaire » puisqu'elles permettent l'activation de protéines comme CAD (**C**aspase **A**ctivated **D**Nase) qui produit les fragments d'ADN, acinus qui stimule la dégradation et HELICARD dont l'activité hélicase favorise la dégradation (**Saelens *et al.*, 2004**).

Cependant il existe aussi une autre voie, indépendante des caspases, impliquée dans l'apoptose nucléaire et modulée par la mitochondrie découverte en utilisant un système acellulaire de coincubation de noyaux et de mitochondries (**Zamzami *et al.*, 1996**). La protéine mitochondriale responsable est l'AIF, libéré de l'espace intermembranaire au cours de l'apoptose, et ce fut le premier facteur apoptogénique montrant une capacité à générer de grands fragments d'ADN nucléaire de 50 kb ainsi qu'une condensation périphérique de la chromatine (**Susin *et al.*, 1999**). Cependant l'AIF ne

semble pas pouvoir générer à lui seul une digestion aussi complète que celle observée lors de l'apoptose, cette digestion oligonucléosomale résultant essentiellement de l'action de CAD.

L'AIF est une flavoprotéine possédant une activité oxydoréductase non essentielle pour sa fonction apoptotique. L'AIF mature (57 kDa) libéré lors de l'apoptose possède une séquence d'adressage nucléaire en C-terminal et possède des charges électrostatiques positives fortes à sa surface soutenant ainsi une capacité de ce facteur à interagir avec l'ADN après sa relocalisation dans le noyau (**Ye *et al.*, 2002**). Son rôle exact dans la mitochondrie est inconnu mais il est possible que paradoxalement l'AIF, au travers de son activité oxydoréductase, exerce une protection contre la mort cellulaire induite par le stress oxydatif (**Klein *et al.*, 2002**). Le mécanisme par lequel l'AIF provoque les phénotypes nucléaires de l'apoptose reste également très flou, cependant il a été observé que son homoloque chez le nématode *C. elegans*, la protéine WAH-1, stimule l'activité d'une autre protéine, CPS-6, elle-même homologue de l'endonucléase G, un autre facteur apoptogénique libéré par la mitochondrie au cours de l'apoptose (**Saelens *et al.*, 2004**).

4. L'endonucléase G

Cette protéine de 30 kDa relocalisée de l'espace intermembranaire vers le noyau au cours de l'apoptose est capable d'induire la dégradation de l'ADN même en absence d'activité caspase ou CAD (**Li *et al.*, 2001**). Cependant son activité exacte au niveau de l'ADN reste floue puisque l'on ne sait pas vraiment si elle induit une digestion internucléosomale comme le décrit le travail du groupe de Wang (**2001**) ou si elle produit de plus grands fragments d'ADN que CAD comme le suggère un autre travail (**van Loo *et al.*, 2001**). En outre il semble que l'endonucléase G puisse coopérer avec d'autres exonucléases et la DNase I (**Widlak *et al.*, 2001**) ce qui peut expliquer la dégradation complète observée par Li *et al.* (**2001**) et l'incapacité de cette protéine à générer seule cette digestion totale de l'ADN observée par van Loo *et al.* (**2001**). Comme il a été dit précédemment chez le nématode C. *elegans* la protéine CPS-6, homologue de l'endonucléase G coopère avec WAH-1, l'homologue de l'AIF et elle possède même la capacité d'induire la dégradation internucléosomale de l'ADN de noyaux issus de cellules de mammifères (**Parrish *et al.*, 2001**). L'endonucléase G apparaît donc comme une protéine importante dans le phénotype nucléaire apoptotique.

5. HtrA2/OMI

De la même manière que les facteurs décrits ci-dessus HtrA2/OMI est le produit d'un gène nucléaire importé dans la mitochondrie où elle réside dans l'espace intermembranaire. Elle appartient à une famille conservée de sérine protéases et présente une homologie de séquence et de structure avec l'endoprotéase bactérienne HtrA/DegP de *E. coli* et jouant un rôle dans la tolérance à la chaleur et au stress oxydatif. HtrA/DegP agit en tant que chaperonne à température normale et présente une activité serine protéase à température élevée impliquée dans l'élimination des protéines mal repliées ou endommagées (**Saelens *et al.*, 2004**).

La protéine HtrA2/OMI est libéré lors de la perméabilisation mitochondriale et possède la capacité d'interagir et d'antogoniser l'ensemble des IAPs excepté la survivin (**Suzuki *et al.*, 2001**). En

effet comme Smac/DIABLO elle possède un domaine IBM (Ala-Val-Pro-Ser) à son extrémité N-terminale et sa fonction d'antagoniste des IAPs favorise la mise en place d'une activité caspase au sein d'extraits cytosoliques (**van Loo *et al.*, 2002a**). En outre son activité serine protéase semble induire la mort indépendamment des caspases (**Hegde *et al.*, 2002**). En plus de ses domaines IBM et serine protéase, HtrA2/OMI possède un domaine PDZ (**P**ost-synaptic **D**isc-large **Z**one); ce type de domaine étant impliqué dans les associations de type peptide/surface gouvernant des voies de transduction du signal (**Harrison, 1996**). La résolution de la structure cristallographique de HtrA2/OMI a montré que cette protéine existe sous la forme d'un assemblage homo-trimèrique modulé par son site catalytique formant ainsi une structure pyramidale avec les trois domaines IBM en haut et les trois domaines PDZ en bas de la structure (**Li *et al.*, 2002**). Le domaine permet de réguler l'activité serine protéase en bloquant le site catalytique. Seule le trimère présente une fonction pro-apoptotique et de façon surprenante en l'absence des domaines de liaisons aux IAPs garde la même capacité apoptotique et à induire l'activation des caspases, ainsi HtrA2/OMI n'induit vraisemblablement pas la mort uniquement du fait de sa capacité à lier les IAPs. Récemment une étude a montré que hPag, une peroxydase cytosolique appartenant à la famille de TSA/AhpC surexprimée en cas de stress oxydatif, interagit avec HtrA2/OMI (**Hong *et al.*, 2006**). Le domaine C-terminal de hPag interagit avec le domaine PDZ de HtrA2/OMI induisant une augmentation de l'activité serine protéase. Ainsi HtrA2/OMI semble jouer un rôle double au cours de l'apoptose, le premier étant lié à sa capacité à antagoniser les IAPs, le second au travers de sa capacité à induire une mort cellulaire indépendante des caspases mal caractérisée.

6. DDP/TIMM8a

La protéine DDP (**D**eafness/**D**ystonia **P**rotein) est une protéine qui fut identifiée comme une protéine mutée responsable du syndrome de Mohr-Tranebjaerg. Cette maladie fut ensuite identifiée en tant que maladie d'origine mitochondriale et DDP comme l'homologue de la petite protéine Tim de levure, Tim8p (**Koehler *et al.*, 1999**). Les petites protéines Tim avec la translocase Tim22 forment le complexe d'importation TIM22 (**T**ranslocase of **I**nner **M**embrane 22) situé dans la membrane interne mitochondriale (**Curran *et al.*, 2002**) (**Koehler, 2004a**). Comme les autres petites protéines Tim, DDP/TIMM8a possède deux motifs jumelés CX_3C (cystéine-X_3-cystéine) essentiels pour sa fonction de chaperonne de l'espace intermembranaire impliquée dans l'importation, l'assemblage et l'insertion dans la membrane interne des précurseurs importés (**Koehler, 2004b**).

Dans l'espace intermembranaire TIMM8a réside sous la forme d'un complexe de 70 kDa formé avec une autre petite protéine Tim, TIMM13b, selon un ratio 3:3 (**Roesch *et al.*, 2002**). DDP/TIMM8a fut identifié initialement comme protéine relarguée à la suite de l'ouverture du pore de perméabilité transitoire ou PTP (**Patterson *et al.*, 2000**). Cependant son rôle dans l'apoptose n'a été déterminé que récemment lors d'une étude montrant que DDP/TIMM8a est libéré dans le cytosol au cours de l'apoptose où elle interagit avec la protéine Drp-1 (**D**ynamin-**r**elated **p**rotein-**1**), une dynamine-like GTPase impliquée dans la fission mitochondriale (**Arnoult *et al.*, 2005a**). Cette interaction promeut le recrutement de Drp-1 à la mitochondrie où elle induit alors le processus de fission (**Frank *et al.*, 2001**)

dont nous reparlerons ultérieurement. De façon intéressante le partenaire mitochondrial de TIMM8a, la protéine TIMM13b est également libéré après perméabilisation de la membrane externe par tBid (**Van Loo *et al.*, 2002b**), cependant le travail de Arnoult *et al.* ne montre pas d'interaction entre TIMM13b et Drp-1.

7. Autres facteurs apoptogéniques mitochondriaux

Il existe d'autres facteurs libérés par la mitochondrie lors de l'apoptose. L'étude la plus récente résulte de l'analyse de surnageants de mitochondries traitées par du tBid (**van Loo *et al.*, 2002b**). Parmi les autres protéines identifiées on trouve les candidats suivants: l'ACBP (**A**cyl-**C**oA-**b**inding **p**rotein), le WD-40 repeat tumor-specific antigen, Upf1, la PTB (**p**olypyrimidine **t**ract-**b**inding protein) et l'adénylate kinse 2 (AK2). Concernant leur fonction exacte lors de l'apoptose, elle reste très mal connue. L'ACBP est un facteur décrit comme étant capable de réduire la concentration de calcium nécessaire à l'activation des calpaïnes, des protéases capables d'activer par clivage des protéines de la famille de Bcl-2 comme Bid (**Chen *et al.*, 2001**) et Bax (**Cartron *et al.*, 2004a**). Le motif WD-40 du WD-40 repeat tumor-specific antigen est retrouvé dans Apaf-1 et est important pour la régulationde l'activation de la caspase 9. Upf1 contrôle l'accumulation d'un vaste nombre d'ARN messagers tandis que la protéine PTB est un régulateur répresseur de splicing alternatif qui semble impliqué dans la traduction de la caspase 2 fonctionnelle (**van Loo *et al.*, 2002b**). Il faut noter toutefois que la localisation mitochondriale de Upf1 et PTB n'est toujours pas confirmée. Quand à AK2 qui catalyse la phophorylation réversible de nucléotides et pourrait peut-être jouer un rôle dans le maintien d'un niveau d'ATP suffisant et nécessaire aux évènements précoces de l'apoptose (**Saelens *et al.*, 2004**). Une autre protéine importante est libérée lors de la perméabilisation mitochondriale, il s'agit d'OPA1 (Dominant **Op**tic **A**trophy Protein **1**) qui est, comme Drp-1, une dynamine-like GTPase jouant un rôle dans le maintien de la structure de la membrane interne et dans le processus de fusion mitochondriale (**Arnoult *et al.*, 2005b**) (**Karbowski & Youle, 2003**) (**Bossy-Wetzel *et al.*, 2003**). Comme nous allons le voir ensuite cette libération est essentielle pour que le cytochrome c soit libéré de façon optimale.

Comme nous avons pu le voir les facteurs apoptogéniques libérés par la mitochondrie au cours de l'apoptose jouent des rôles essentiels et variés dans ce processus de mort (figure 2). Ceci montre donc l'importance du rôle de cet organite dans la mort cellulaire qui est ainsi directement impliqué dans la cascade d'activation des caspases, dans la condensation de la chromatine, la dégradation de l'ADN ainsi que dans l'altération de sa propre morphologie. La mitochondrie se place ainsi en tant qu'acteur central du processus apoptotique.

8. Cinétique des évènements et de la libération des protéines apoptogéniques

Diverses études sur la cinétique de libération des protéines apoptogéniques ont montré que la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie au cours de l'apoptose ne conduit pas à une libération massive de ces facteurs mais que ce mécanisme suit un timing bien défini. Ce timing est ainsi en désaccord avec une des premières hypothèses selon laquelle la libération des facteurs mitochondriaux pourrait être dû à l'ouverture du pore de perméabilité transitoire (PTP) entraînant la perte du potentiel de membrane mitochondrial ou ΔΨm, le gonflement de la membrane interne et l'éclatement de la membrane externe. A ce jour il semble évident que ce phénomène correspond à une séquence d'évènements suivants une cinétique bien précise que nous allons résumer ici.

Parmi les facteurs mitochondriaux apoptogénique le cytochrome c est celui qui a fait l'objet du

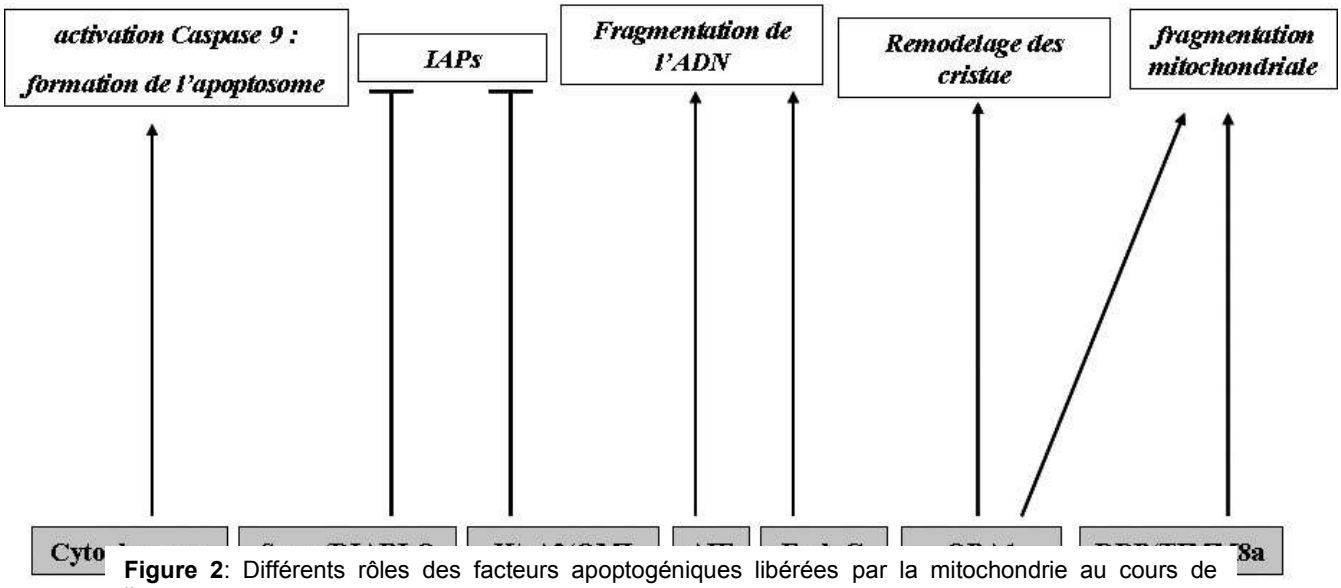


Figure 2: Différents rôles des facteurs apoptogéniques libérées par la mitochondrie au cours de l'apoptose

plus grand nombre d'études. Comme nous l'avons vu précédemment le cytochrome c doit être mobilisé au préalable avant d'être libéré, ceci étant dû aux interactions entre cette protéine et la membrane interne. Ainsi le premier évènement se produisant lors de la perméabilisation mitochondriale est une réorganisation structurale de la membrane interne. Des analyses de la topologie de cette dernière ont permis de découvrir que celle-ci présente des crêtes tubulaires formant des invaginations de cette membrane. Ces crêtes forment un compartiment isolé de l'espace intermembranaire par des jonctions fermées et c'est au sein de ce compartiment qu'a lieu la phosphorylation oxydative (**Mannella *et al.*, 2001**). La plus grande partie du cytochrome c est donc contenue dans ces crêtes mitochondriales et lors de l'induction de l'apoptose par tBid, elles sont remodelées de façon à ce qu'il y ait ouverture des jonctions permettant l'ouverture de ce compartiment vers la lumière de l'espace intermembranaire (**Scorrano *et al.*, 2002**). Ce remodelage

semble lié à la libération dans le cytosol d'un autre facteur, OPA1 qui joue un rôle dans la fusion mitochondriale mais également dans le maintien de la structure des crêtes mitochondriales (**Arnoult *et al.*, 2005b**). La libération d'OPA1 facilite la libération du cytochrome c et ces deux protéines sont co-libérées bien que la durée de translocation d'OPA1 soit plus longue. En réalité ce sont des oligomères d'OPA1 qui maintiennent les jonctions des crêtes fortement closes et ces oligomères sont disruptés sous l'action de tBid (**Frezza *et al.*, 2006**). En outre ce remodelage est accompagné par des ouvertures transitoires du PTP, c'est ce qui a probablement amené à penser que le PTP pouvait être impliqué dans la libération du cytochrome c.

Après cette réorganisation ultrastructurale de la membrane interne, le cytochrome c peut être libéré de façon optimale. Sa libération se produit très précocement suite à la perméabilisation de la membrane externe. L'étude d'une protéine de fusion cytochrome c-GFP a permis de mettre en évidence que la libération du cytochrome c précède l'exposition des phosphatidylsérines et la perte d'intégrité de la membrane plasmique et se fait en 5 minutes quelques soit le stimulus apoptotique utilisé (**Goldstein *et al.*, 2000**). En outre cette libération n'est pas altérée au sein d'une gamme de température allant de 24 °C à 37 °C supportant ainsi le modèle d'une translocation au travers de la membrane externe par un pore plutôt que par un système de type enzymatique. En outre l'utilisation d'un inhibiteur de caspase à large spectre, le zVAD-fmk, ne change en rien la cinétique de libération du cytochrome c même si dans ce cas le ΔΨm est maintenu, ce qui exclu l'implication du PTP dans ce processus. D'autres travaux ont validé ces résultats notamment en comparant les inducteurs de perméabilisation mitochondriale que sont le TNFα, la staurosporine (STS) ou la valinomycine et leur impact sur le mécanisme de libération du cytochrome c (**Luetjens *et al.*, 2001**). Ces résultats s'accordent avec ceux présentés par Goldstein *et al.* (**2000**) dans la mesure où la cinétique de libération de cytochrome c est similaire après traitement par TNFα ou STS, deux stimuli apoptotiques connus. En revanche la valinomycine, un ionophore mitochondrial dont l'action est connue pour entraîner l'ouverture de PTP, n'induit qu'une très faible libération du cytochrome c d'où la confirmation que le PTP n'est pas le canal par lequel le cytochrome c est libéré. D'autres travaux confirment aussi que la libération du cytochrome c et le gonflement mitochondrial sont deus évènement temporellement et fonctionnellement distincts. En effet l'utilisation de différents traitements sur des cellules HeLa (UV, STS…) a permis de mettre en évidence que le gonflement mitochondrial survient environ 10 minutes après la libération du cytochrome c (**Gao *et al.*, 2001**). Un autre travail similaire montre que effectivement que la perte du ΔΨm n'est observé qu'une dizaine de minutes après la libération du cytochrome c et qu'en outre l'utilisation de zVAD permet de maintenir le ΔΨm sans affecter la relocalisation du cytochrome c (**Waterhouse *et al.*, 2006**). De plus l'ajout d'ATP extra-mitochondrial inhibe la dépolarisation mitochondriale induite par tBid sans modifier la translocation du cytochrome c (**Madesh *et al.*, 2002**). Ceci suggère donc que l'activité des caspases est nécessaire pour maintenir la perte du ΔΨm, or l'activation de celles-ci requiert au préalable la relocalisation du cytochrome c vers le cytoplasme.

Le timing de translocation vers le cytosol d'autres facteurs apoptogéniques a également été étudié, en particulier pour Smac/DIABLO. La libération de ce dernier se fait simultanément avec le cytochrome c et précède la perte du ΔΨm (**Madesh *et al.*, 2002**). Cependant la libération de

Smac/DIABLO dure environ quatre fois plus longtemps que celle du cytochrome c (**Springs *et al.*, 2002**) mais elle survient avant la fragmentation de l'ADN suggérant ainsi l'importance de ce facteur dans la fragmentation de l'ADN induit par les caspases. La libération de Smac débute avec celle du cytochrome c, la différence de cinétique entre les deux étant donc probablement dû à leur différence de taille (**Rehm *et al.*, 2003**). Comme pour le cytochrome c, la libération de Smac est indépendante de l'activité des caspases (**Luetjens *et al.*, 2001**) (**Lim *et al.*, 2006**) et une dépolarisation mitochondriale significative n'est observée qu'à la suite de la déplétion complète de la mitochondrie en cytochrome c et Smac/DIABLO.

Pour ce qui est des autres protéines libérées après la perméabilisation de la membrane externe il existe peu de travaux les concernant. Cependant il apparaît que les facteurs apoptogéniques puissent être divisés en deux classes: ceux dont la libération est indépendante des caspases et ceux nécessitant la mise en place d'une activité caspase. En effet alors que le cytochrome c, Smac/DIABLO et HtrA2/OMI sont relocalisés précocement vers le cytosol indépendamment de l'activation des caspases, la libération de l'AIF et de l'endonucléase G ne peut se faire qu'en présence d'une activité des caspases (**Arnoult *et al.*, 2003**). De ce fait en bloquant l'activation des caspases, par emploie de zVAD-fmk ou de cellules déficientes en Apaf-1, l'AIF et l'endonucléase G restent dans la mitochondrie alors que le cytochrome c, Smac/DIABLO et HtrA2/OMI sont libérés normalement. En outre ce travail appuie les résultats des cinétiques déjà observées pour le cytochrome c et Smac/DIABLO et montre que la libération de HtrA2/OMI est plus tardive probablement à cause de sa taille plus importante. Pour ce qui est de DDP/TIMM8a, il est co-libéré avec le cytochrome c mais la durée de sa libération est plus longue que pour ce dernier et est à peu près équivalente à celle d'OPA1. Comme nous l'avons déjà dit, TIMM8a induit le recrutement de Drp-1 à la mitochondrie ce qui provoque ensuite le processus de fragmentation mitochondriale. Cette fragmentation débute 10 minutes après la libération du cytochrome c et s'achève au bout d'environ 20 minutes (**Arnoult *et al.*, 2005b**).

A partir de ces données il est possible de proposer un modèle temporel global des évènements impliqués dans la voie mitochondriale de l'apoptose et faisant suite à la perméabilisation induite par les protéines pro-apoptotiques effectrices de la famille de Bcl-2 (figure 3). La première étape est un remodelage structural de la membrane interne par désassemblage des oligomères d'OPA1, ce qui mobilise le cytochrome c qui est alors rapidement libéré (figure 3B). De façon simultanée à la libération de cytochrome c, Smac/DIABLO, DDP/TIMM8a, OPA1 et un peu plus tardivement HtrA2/OMI sont également libérés. La première conséquence de cette libération est l'activation des caspases culminant avec l'activation des caspases effectrices 3, 6 et 7 (figure 3C). Une des premières cibles des caspases effectrices est la sous-unité p75 du complexe I de la chaîne de transport d'électron de la mitochondrie aboutissant ainsi à une perte du $\Delta\Psi m$ (**Ricci *et al.*, 2004**) et au gonflement mitochondrial et endommageant des fonctions majeures de la mitochondrie. Parallèlement à ceci le facteur DDP/TIMM8a recrute Drp-1 à la mitochondrie et un processus de fragmentation mitochondriale débute. Les caspases effectrices permettent également l'activation de protéines comme CAD et acinus ainsi que la libération des facteurs mitochondriaux que sont l'AIF et

l'endonucléase G. Ces dernières protéines citées se relocalisent dans le noyau où elles provoquent alors une condensation de la chromatine et la dégradation de l'ADN (figure 3C). Environ 20 minutes après la libération complète du cytochrome c, le réseau mitochondrial est presque totalement fragmenté (figure 3C). A ce moment là l'ensemble des fonctions vitales de la cellule sont irréversiblement endommagées, la membrane plasmique bourgeonne, conduisant à la formation de corps apoptotiques, et expose des résidus de phosphatidylsérine sur la face extracellulaire permettant l'élimination de la cellule mourante par des phagocytes.

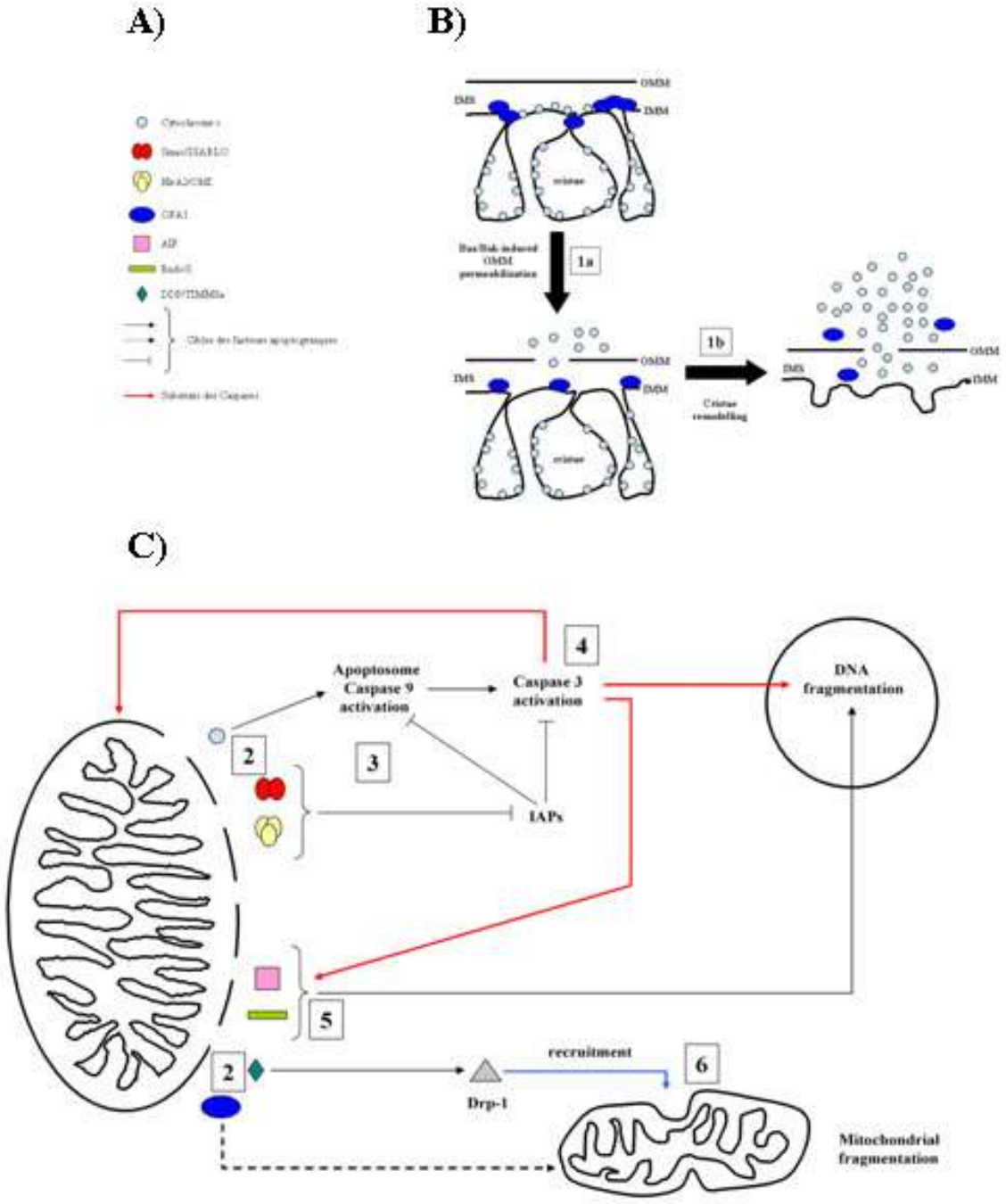


Figure 3: Evènements de la voie mitochondriale de l'apoptose. A) Légende. B) Mobilisation puis libération du cytochrome c par remodelage des cristae. C) Libération des autres facteurs apoptogéniques comme Smac/DIABLO, HtrA2/OMI potentialisant l'activation des caspases mais aussi de DDP/TIMM8a et OPA1 (2). Le cytochrome c cytosolique participe à la formation de l'apoptosome (3). Ceci aboutit à l'activation des caspases effectrices (4) qui à leur tour clivent leurs substrats et induisent la libération de l'AIF et de l'endonucléase G (5). Enfin le recrutement de Drp-1 induit par DDP/TIMM8a conduit à la fragmentation du réseau mitochondrial (6).

(D'après G. Bellot, F.M. Vallette & L. Olive**r; "***The implication(s) of mitochondrial permeability in the execution phase of apoptosis."***, sous presse)**

C. REGULATION DE LA VOIE MITOCHONDRIALE DE L'APOPTOSE PAR LES PROTEINES DE LA FAMILLE DE BCL-2

Comme il a déjà été précisé la voie mitochondriale de l'apoptose est régulé par la famille des protéines de la famille de Bcl-2. En effet cette famille protéique contrôle cette voie apoptotique en l'induisant ou en la réprimant et ce en fonction des différents types de stimuli apoptotiques. Au cours de l'apoptose ce sont deux de ses membres, les protéines Bax et Bak, qui sont à l'origine de la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie et donc de l'ensemble des évènements se produisant après cette perméabilisation.

1. Les protéines de la famille de Bcl-2

Ce sont donc les régulateurs centraux de la voie intrinsèque de l'apoptose car ce sont ces protéines qui contrôlent l'augmentation de perméabilité mitochondriale (**Cory & Adams, 2002**). A ce jour, chez les mammifères, il existe environ une vingtaine de membres de la famille de Bcl-2 identifiés. Ces protéines sont caractérisées par des domaines d'homologie à Bcl-2 ou domaines BH. Cette famille de protéines peut être subdivisée en deux sous-familles: les membres anti-apoptotiques et les membres pro-apoptotiques. Au sein des protéines pro-apoptotiques deux autres classes de protéines peuvent être définies: les membres pro-apoptotiques à multidomaines et les protéines à BH3 unique ou BOP (**B**H3 **O**nly **P**roteins).

Les membres anti-apoptotiques comme Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w, A1/Bfl-1, Boo/Divaet NR-13 sont caractérisés par la présence de quatre domaines d'homologie à Bcl-2 (BH1, BH2, BH3 et BH4). Ils agissent en antagonisant l'action les protéines pro-apoptotiques (Antonsson et al., 1997) (Cheng et al., 2001) et sont ainsi considérés comme des facteurs de survie. Le domaine BH4, qui n'existe que dans cette classe de protéines, apparaît être impliqué dans leur activité anti-apoptotiques (**Huang *et al.*, 1998**).

Les protéines à BH3 unique comme leur nom l'indique sont caractérisées par la présence d'un seul domaine d'homologie à Bcl-2, le domaine BH3. Ce sont des senseurs de stress qui induisent l'apoptose en activant les protéines pro-apoptotiques à multidomaines ou en antagonisant les membres anti-apoptotiques (**Moreau *et al.*, 2003**) (**Juin *et al.*, 2005**). Parmi les BOP se trouvent les protéines Bid, Bad, Bim, Bik, Hrk, Bmf, Noxa, PUMA et BNIP3. Chacun de ces BOP peut être activé suivant un type particulier de stimulus (**Huang & Strasser, 2000**). Cependant ils sont incapables d'induire l'apoptose en absence des membres pro-apoptotiques à multidomaines Bax et Bak.

Le second groupe de protéines pro-apoptotiques inclus Bax, Bak, Bok et Bcl-x_S. Bax et Bak sont considérés comme étant les principaux effecteurs de l'apoptose contrôlée par les protéines de la famille de Bcl-2. Ces protéines contiennent trois domaines BH (BH1, BH2 et BH3). Bax et Bak sont les acteurs essentiels de la voie mitochondriale de l'apoptose (**Wei *et al.*, 2001**) et induisent tous les deux la libération de cytochrome c (**Degenhardt *et al.*, 2002**). L'extinction du gène de Bax confère une résistance significative à l'apoptose alors que l'absence de Bak n'entraîne que peut d'effet de résistance. Cependant l'extinction des deux gènes se traduit par une résistance totale des cellules aux stimuli apoptotiques (**Degenhardt *et al.*, 2002**) (**Cartron *et al.*, 2003a**). Leur potentiel cytotoxique est modulé par leur domaine BH3 (**Chittenden *et al.*, 1995a**).

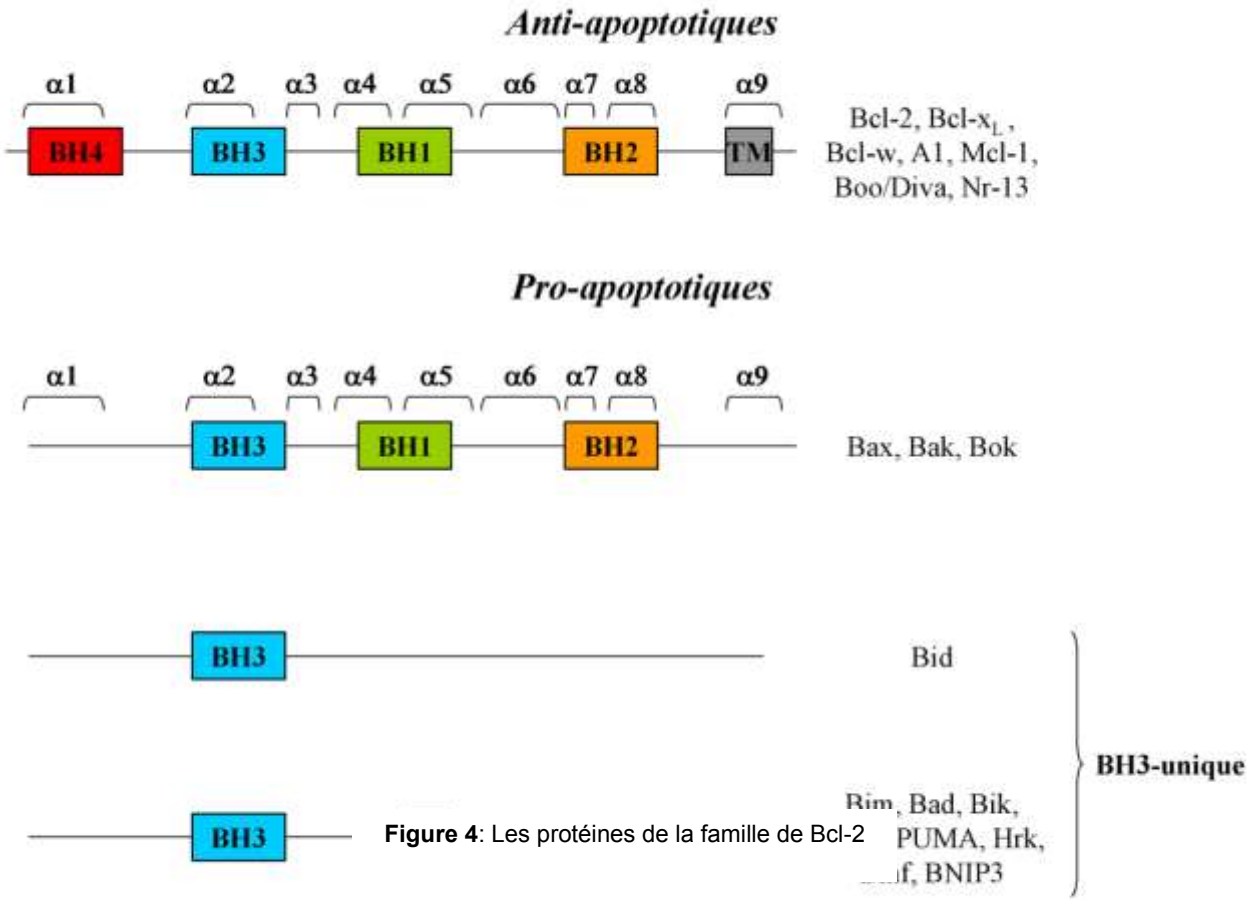


Figure 4: Les protéines de la famille de Bcl-2

2. Relation entre la structure et la fonction des protéines de la famille de Bcl-2

a) Structure

Une partie des résultats intéressants au sujet du mode de fonctionnement de ces protéines a pu être mis en évidence grâce à la résolution de la structure tridimensionnelle de certains membres de

la famille de Bcl-2 recouvrant les trois catégories de protéines retrouvées dans cette famille. La détermination des structures des protéines comme Bcl-x_L (**Muchmore *et al*., 1996**), Bcl-2 (**Petros *et al*., 2001**), Bid (**Chou *et al*., 1999**) (**McDonnell *et al*., 1999**) et Bax (**Suzuki *et al*., 2000**) révèle que ces protéines partagent une très forte homologie structurale. En effet elles apparaissent toutes être composées de sept à neuf hélices α (Hα) malgré leurs fonctions différentes voire même opposées. La structure globale de ces protéines se présente sous la forme d'une grappe globulaire d'Hα amphipatiques recouvrant deux hélices centrales hydrophobes, pour les membres à multidomaines ces hélices hydrophobes sont les Hα5 et Hα6.

b) Homologie avec les toxines bactériennes

De façon très intéressante la mise en évidence de ces structures a permis de découvrir que les protéines de la famille de Bcl-2 partagent une homologie très forte avec des toxines bactériennes formant des pores, les αPFTs (**α**-**p**ore-**f**orming **t**oxins), telles que la colicine E1, la colicine Ia et la toxine diphtérique. Ces toxines contiennent un domaine de formation du pore de dix Hα dont deux hélices centrales hydrophobes s'insérant précocement dans la membrane lors de la formation du pore (**Wiener *et al*., 1997**) (**Zakharov & Cramer, 2002a**). Le mécanisme fonctionnel par lequel ces toxines s'insèrent dans les membranes requiert trois étapes: une étape d'adressage membranaire, une étape de déploiement de la structure et enfin une étape d'insertion (**Parker & Feil, 2005**) (**Tilley & Saibil, 2006**). L'étape d'adressage se fait via un domaine spécifique de la toxine qui reconnaît une protéine de la membrane cible qui lui sert ainsi de récepteur. Ce type de mécanisme d'adressage est retrouvé dans l'ensemble des classes de protéines formant des pores comme les αPFTs ou les βPFTs qui, comme leur nom l'indique, ne se composent pas d'hélices α mais de feuillets β. En démonstration de la conservation de ce mécanisme d'adressage on peut même citer l'exemple de toxines de type βPFT mais à deux composantes, c'est à dire que la toxine elle-même est formée de deux sous-unités. Dans ce cas précis on trouve une sous-unité S possédant un domaine reconnaissant une protéine membranaire et suite à l'adressage de cette protéine de classe S, la seconde sous-unité de classe F contenant le domaine de formation du pore vient s'insérer dans la membrane (**Parker & Feil, 2005**). Pour les αPFTs elles possèdent toutes le domaine d'adressage et le domaine de formation du pore au sein de la même séquence polypeptidique. Pour la seconde étape de déploiement des hélices amphipatiques initiant l'insertion de la protéine dans la membrane selon un type de modèle appelé le modèle de l'ombrelle, il résulte d'un changement de conformation important de la protéine (**Zakharov & Cramer, 2002b**). Cette modification structurale est assimilée à une activation de la toxine. De telles modifications de structures peuvent être induites par des variations de pH comme pour la colicine E1 qui forme des pores membranaires après une « activation acide » (**Musse & Merrill, 2003**). Ce type de sensibilité au pH est très conservé au sein des toxines bactériennes. L'insertion membranaire de la toxine faisant suite à son activation conduit à son oligomérisation dans la membrane provoquant la formation d'un pore (**Parker & Feil, 2005**).

En outre il est déjà connu que certaines toxines bactériennes sont capables d'induire l'apoptose. Pour exemple on peut citer l'aerolysine qui cible les lymphocytes T en interagissant avec la protéine Thy-1, s'insère dans la membrane plasmique puis induit un influx de calcium, l'activation

des caspases et la fragmentation de l'ADN (**Nelson *et al*., 1999**); l'action de cette toxine est inhibée par Bcl-2. La toxine α de *Staphylococcus aureus*, une αPFT, est également un inducteur d'apoptose (**Menzies & Kourteva, 2000**) et elle induit l'activation de la caspase 3 en activant la voie intrinsèque de l'apoptose c'est à dire par induction de la libération du cytochrome c et l'activation de la caspase 9 (**Bantel *et al*., 2001**). Une leukotoxine produite par *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cible la cellule en interagissant avec la protéine LFA-1 et induit également la libération de cytochrome c, la perte du ΔΨm et l'activation des caspases (**Korostoff *et al*., 2000**). Une autre toxine produite par *Staphylococcus aureus*, la Panton-Valentine Leukocidin ou toxine PVL, une βPFT induit l'apoptose en ciblant directement la mitochondrie où elle induit la libération de cytochrome c et de Smac/DIABLO et l'activation subséquente des caspases 9 et 3 (**Genestier *et al*., 2005**). Ainsi il apparaît que des toxines bactériennes sont capables d'induire l'apoptose de leurs cellules cibles ceci suggérant que les protéines de la famille de Bcl-2 pourrait avoir adopter le même mode de fonctionnement.

Et en effet les travaux effectués sur la famille de Bcl-2 montrent que ces protéines présentent, en plus d'une homologie structurale avec ces toxines, une homologie dans leur mode de fonctionnement. Un point important est que des protéines telles que Bcl-2 (**Schendel *et al*., 1997**) (**Schlesinger *et al*., 1997**) (**Antonsson *et al*., 1997**), Bcl-x_L (**Minn *et al*., 1997**) et Bax (**Schlesinger *et al*., 1997**) (**Antonsson *et al*., 1997**) induisent la formation de pores dans des membranes lipidiques artificielles. La fonction de ces protéines impliquent que celles-ci doivent subir une activation au préalable c'est à dire que Bax et Bak entre autres subissent un profond changement de conformation avant de provoquer la perméabilisation mitochondriale (**Desagher *et al*., 1999**) (**Griffiths *et al*., 1999**). Ce type de changement de conformation peut être stimulé par des variations de pH (**Cartron *et al*., 2004b**). De plus à l'image des toxines bactériennes, les protéines de la famille de Bcl-2 sont capables de former des hétéro-oligomères (**Sattler *et al*., 1997**) ou des homo-oligomères (**Antonsson *et al*., 2000**) (**Antonsson *et al*., 2001**) et l'oligomérisation de Bax et Bak est nécessaire pour perméabiliser la membrane externe mitochondriale (**Antonsson *et al*., 2001**) (**Mikhailov *et al*., 2003**). L'hétéro-dimérisation de ces protéines implique une interaction entre le domaine BH3 d'une protéine pro-apoptotique et une plus large surface d'un membre anti-apoptotique incluant ces domaines BH1 et BH2 (**Petros *et al*., 2004**).

Ainsi que nous venons de le voir l'action des protéines de la famille de Bcl-2 ressemble fortement à celle de certaines toxines bactériennes formant des pores et ainsi apporte une pierre supplémentaire à la théorie de l'endosymbiose entre des archaebactéries et des cellules eucaryotes expliquant l'origine des mitochondries. Les protéines de la famille de Bcl-2 pourraient alors être le fruit de l'évolution d'un transfert horizontal de gènes entre les bactéries originelles et leur cellule hôte (**Koonin & Aravind, 2002**).

3. Régulation de la perméabilité mitochondriale par les protéines de la famille de Bcl-2 au cours de l'apoptose

a. Les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-x_L

La protéine Bcl-2 (**B** **c**ell **l**ymphoma gene **2**) a été découverte après observation d'une translocation chromosomique dans des cellules de lymphomes humains. La mise en évidence de son rôle inhibiteur de la mort cellulaire le définit en tant que proto-oncogène. Ce fut le premier membre identifié de cette famille de protéines. Il se localise au sien de trois endomembranes: la membrane externe de l'enveloppe nucléaire, le réticulum endoplasmique et la membrane externe mitochondriale (**Krajewski *et al*., 1993**) (**Janiak *et al*., 1994**) (**Lithgow *et al*., 1994**). Sa localisation majeure reste toutefois la mitochondrie ou Bcl-2 est présente en tant que protéine intégrale. Initialement décrit comme une protéine de la membrane interne (**Hockenbery *et al*., 1990**) il fut confirmé par la suite que Bcl-2 cible spécifiquement la membrane externe mitochondriale via son Hα9 C-terminale (**Nguyen *et al*., 1993**). Son adressage semble emprunter une voie similaire à celle du récepteur Mas70p de levure et ses 22 résidus C-terminaux constituent un ancrage membranaire laissant le reste du corps de la protéine exposée vers le cytosol. Plus récemment sa voie d'adressage mitochondriale a été décrite plus précisément dans un modèle de levure. En réalité Bcl-2 est adressé à la membrane externe via une interaction spécifique avec le récepteur d'importation Tom20 (**Motz *et al*., 2002**). Cette interaction est rendue possible par deux résidus lysine flanquants l'ancre C-terminale. Aucune interaction avec d'autres protéines du complexe d'importation comme Tom22, Tom5 et Tom40 ne semble exister suggérant qu'il n'y pas translocation de Bcl-2 au travers du pore d'importation général comme c'est le cas pour la porine mitochondriale ou Tom40. Récemment il a été observé que Bcl-2 subit un changement de conformation, pouvant être induit par des BOP comme Bim, au cours de l'apoptose et permettant ainsi l'insertion de ses deux hélices centrales Hα5 et Hα6 (**Kim *et al*., 2004**). De cette façon il semble que l'activité anti-apoptotique de Bcl-2 nécessite une étape de réarrangement structural permettant une insertion plus complète de Bcl-2 dans la membrane externe. Cette nouvelle conformation de Bcl-2 serait alors requise pour la formation d'hétérodimères « inactifs » avec Bax et Bak afin de prévenir leur homo-oligomérisation.

Contrairement à Bcl-2 la protéine Bcl-x_L est essentiellement cytosolique et une fraction mineure est associée à la membrane mitochondriale en conditions normales (**Hsu *et al.*, 1997a**). En revanche lors de l'induction du processus apoptotique Bcl-x_L se relocalise exclusivement sur la membrane mitochondriale suggérant un changement de conformation de la protéine. Les résidus basiques situés de part et d'autre de l' Hα9 font de cette séquence une séquence complète d'adressage mitochondriale similaire aux séquences signales de la classe des protéines ancrées par le C-terminal (**Kaufmann *et al.*, 2003**). D'un point de vue structural l'Hα9 ainsi que les hélices Hα5 et Hα6 sont capables de s'insérer dans des membranes suggérant que le changement de conformation serait semblable à celui de Bcl-2 et résulterait dans l'insertion des hélices Hα5 et Hα6 dans la membrane mitochondriale (**Garcia-Saez *et al*., 2004**). Plus récemment il a même été proposé un modèle complet de l'insertion de Bcl-x_L. Ce modèle montre que cette protéine possède trois formes stables: une forme soluble, une forme ancrée par son domaine C-terminal dont le corps de la protéine reste semblable à la forme soluble et une forme totalement déployée insérée dans la membrane externe (**Thuduppathy *et al*., 2006**). Dans ce modèle la forme cytosolique serait maintenue dans un état soluble par une liaison du C-terminal avec la poche réceptrice des domaines BH3 (**Sattler *et al.*, 1997**) ou une

interaction avec un autre facteur cytosolique. Suivant un stimulus apoptotique une des premières étapes du changement conformationnel aboutirait à l'exposition de l'ancre C-terminal conduisant à l'adressage de Bcl-x_L à la mitochondrie et à son insertion via ce domaine transmembranaire. A ce stade ce facteur anti-apoptotique serait compétant pour interagir avec les domaines BH3 des protéines pro-apoptotiques comme Bax et Bak. Dans la dernière étape Bcl-x_L serait totalement déployé et s'inclurait complètement dans la membrane externe via une insertion par ses Hα5 et Hα6. En revanche il est difficile de déterminer si cette dernière étape serait le résultat de l'hétérodimérisation ou s'il elle précèderait ce mécanisme.

Ainsi il apparaît que ces protéines anti-apoptotiques agissent en subissant un changement de conformation ce qui les rend compétentes pour former des hétérodimères avec Bax et Bak empêchant ainsi ces dernières de s'homo-oligomériser et d'induire la perméabilisation mitochondriale.

b. Les protéines à BH3 unique: la protéine Bid

Dans les cellules saines la protéine Bid existe sous une forme cytosolique inactive. Lors de l'induction apoptotique Bid peut être clivé par la caspase 8 et sa forme tronquée, tBid, se relocalise à la mitochondrie (**Li *et al*., 1998**). C'est ce clivage par la caspase 8, caspase initiatrice de la voie extrinsèque, qui permet de relier la voie des récepteurs de mort à la voie intrinsèque. Après cette étape de clivage tBid est capable d'activer les effecteurs pro-apoptotiques Bax (**Moreau *et al*., 2003**) (**Cartron *et al*., 2004c**) et Bak (**Wei *et al*., 2000**). Ce clivage peut être effectué par d'autres protéases comme la calpaïne (**Chen *et al*., 2001**) mais aussi Granzyme B. De façon intéressante Granzyme B induit la génération de deux formes de tBid, un produit de clivage direct (p15tBid) et un produit généré indirectement résultat de l'activation de la caspase 8 par Granzyme B (p13tBid). En outre la forme p15tBid active préférentiellement Bak alors que p13tBid active préférentiellement Bax (**Cartron *et al*., 2003a**).

Sa structure globale est bien sûr similaire aux autres membres de la famille de Bcl-2 avec huit Hα dont hélices centrales hydrophobes (**McDonnell *et al*., 1999**) (**Chou *et al*., 1999**). La différence ici est que ces deux hélices centrales équivalentes au segment Hα5-Hα6 des autres protéines décrites sont les hélices Hα6 et Hα7 (**Garcia-Saez *et al*., 2005**). Le segment clivé lors l'activation de Bid correspond à ces deux premières hélices α. La dernière information est que Bid ne possède pas de domaine transmembranaire en C-terminal. Il apparaît que tBid nécessite la présence de cardiolipine pour être adressé à la mitochondrie (**Lutter *et al*., 2000**). La cardiolipine est un phospholipide spécifique de la mitochondrie où on la retrouve dans la membrane interne et au niveau des sites de contacts (**McMillin & Dowhan, 2002**). En outre il semble que tBid possède une activité de transfert de lipides (**Degli Esposti *et al*., 2001**) et se localise préférentiellement au niveau des sites de contact (**Lutter *et al*., 2001**). Ce type d'activité et sa localisation conforte son action au niveau du remodelage des crêtes mitochondriales permettant la mobilisation du cytochrome c. En outre il semble exister une coopération entre Bid, Bax et les cardiolipines lors de la perméabilisation membranaire induite par Bax (**Kuwana *et al*., 2002**). Ce qui peut sembler paradoxal c'est que les cardiolipines sont métabolisées lors du processus apoptotique ce qui rentre en accord avec le mécanisme de mobilisation du cytochrome c mais pas dans le cadre de la coopération entre Bid, Bax et ces phospholipides pour la

formation de pores. En réalité il semble que tBid interagisse plutôt avec des métabolites issus des cardiolipines, notamment la monolysocardiolipine (**Degli Esposti *et al*., 2003**). Ces métabolites issus de la dégradation des cardiolipines diffusent dans les membranes interne et externe au cours de l'apoptose et il est possible de supposer que la formation d'aires riches en monolysocardiolipine induite par tBid permette de préparer la membrane à la formation de pores générés par Bax et Bak. Il existe également une protéine de la membrane externe identifiée en tant que récepteur de tBid au cours de l'apoptose, il s'agit de Mtch2 (**M**i**t**ochondrial **c**arrier **h**omolog **2**) dont le rôle propre est inconnu (**Grinberg *et al*., 2005**). La formation de ce complexe peut être bloquée en surexprimant Bcl-x_L et Bax se co-localise avec ce complexe. Ainsi la protéine Bid joue un rôle majeure dans l'activation de Bax et de Bak mais également dans la mobilisation du cytochrome c de part son rôle dans le remodelage des cristae. Récemment il a été mis en évidence que la protéine à BH3 unique Bik, qui agit au niveau du réticulum endoplasmique, induit aussi un remodelage des cristae dépendant du Ca^{2+} libéré par le réticulum et capté par la mitochondrie (**Germain *et al*., 2005**). Il semble donc que le rôle d'au moins certaines protéines à BH3 soit également d'induire la mobilisation indépendamment de leur action sur Bax et Bak.

c. perméabilisation de la membrane externe par Bax et Bak

Comme nous l'avons dit auparavant l'étape de perméabilisation est sous le contrôle des protéines Bax et Bak dont nous reparlerons davantage dans la partie des résultats. La fonction de Bax est celle qui a été le plus largement étudié. Bax est une protéine cytosolique en conditions non apoptotiques bien qu'une faible fraction puisse être retrouvé au niveau de la mitochondrie (**Hsu *et al*., 1997**). Durant le processus apoptotique Bax est transloqué vers la mitochondrie où il induit l'augmentation de la perméabilité mitochondriale initiant la libération des facteurs apoptogéniques comme le cytochrome c (**Degenhardt *et al*., 2002**). Cette perméabilisation est associée à la formation d'oligomères de Bax (**Antonsson *et al*., 2001**). En outre Bax peut générer la formation de pores dans des membranes artificielles (**Schlesinger *et al*., 1997**) et la formation de ces pores est inhibée par Bcl-2 (**Antonsson *et al*., 1997**). L'oligomérisation de Bax est indispensable à la formation de pores par Bax (**Antonsson *et al*., 2000**). Il faut également noter que des modélisations de protéines de la famille de Bcl-2 réalisées à partir de la structure du cristal de Bcl-x_L prédisent que c'est Bax qui possède le plus grand potentiel d'insertion et vraisemblablement de formation de pores membranaires (**Aritomi *et al*., 1997**). Comme les autres protéines de cette famille c'est une protéine globulaire de neuf hélices α avec les deux hélices hydrophobes Hα5 et Hα6 enfouies dans le cœur de la protéine (**Suzuki *et al*., 2000**). En outre la structure RMN de Bax révèle que ces deux extrémités N et C-terminales sont extrêmement mobiles et comme nous le verrons par la suite ceci constitue un point essentiel dans la régulation de la fonction de Bax. La relocalisation de Bax au cours de l'apoptose est le résultat d'un profond changement de conformation conduisant à son insertion par ses hélices Hα5 et Hα6 (**Cartron *et al*., 2005**). Ce sont également ces deux hélices Hα5 et Hα6 qui sont indispensables pour la perméabilisation membranaire (**Heimlich *et al*., 2004**) et qui sont capables de générer la formation de pores (**Garcia-Saez *et al*., 2005**) (**Garcia-Saez *et al*., 2006**).

En ce qui concerne Bak il existe très peu de données illustrant son mode de fonctionnement ceci étant essentiellement dû au manque de données structurales le concernant. Il a été initialement identifié par clonage d'ADNc homologues de Bcl-2 (**Chittenden *et al*., 1995b**) (**Kiefer *et al*., 1995**) mais aussi comme partenaire d'interaction de la protéine E1B 19K, un homologue viral de Bcl-2 (**Farrow *et al*., 1995**). Bien qu'étant homologue de Bak ces deux protéines ne semblent pas posséder de rôles redondants (**Cartron *et al*., 2003a**). Ces rôles non redondants de Bax et de Bak sont illustrés par l'observation des phénotypes de souris knockout pour l'une ou l'autre des protéines. En effet les souris Bak KO apparaissent être tout à fait normales (**Lindsten *et al*., 2000**) alors que les souris Bax KO présentent quelques anomalies phénotypiques comme une hyperplasie des thymocytes et des cellules B ainsi qu'une infertilité des souris mâles (**Knudson *et al*., 1995**). La première différence observée entre Bak et Bax est leur différence de localisation. Alors que Bax est une protéine cytosolique en conditions normales, son homologue pro-apoptotique Bak est constitutivement associé à des endomembranes, majoritairement la membrane externe mitochondriale (**Griffiths *et al*., 1999**) (**Wei *et al*., 2000**) mais aussi le réticulum endoplasmique (**Scorrano *et al*., 2003**). Lors du mécanisme apoptotique Bak est activé, par tBid par exemple (**Wei *et al*., 2000**), et subit un changement de conformation avant d'induire la perméabilisation mitochondriale (**Griffiths *et al*., 1999**). Ce qui est également connu c'est que dans des conditions non apoptotiques, Bak est contenu dans des complexes de tailles très variés allant de 43 à 5000 kDa et que lors du processus apoptotiques il se réarrange par homo-oligomérisation en plus petits complexes allant de 67 à 700 kDa (**Mikhailov *et al*., 2003**). En outre une analyse en gel bidimensionnel suggère que Bak existe fondamentalement sous plusieurs isoformes indépendamment de son état d'activation, ceci conduisant à penser qu'il peut subir plusieurs modifications post-traductionnelles (**Griffiths *et al*., 1999**). Ces modifications pourraient expliquer la vaste gamme de complexes dans laquelle Bak est contenu, au moins dans des conditions non apoptotiques. Comme nous le verrons dans la partie résultat le statut « complexé » de Bak est essentiel pour la fonction qu'il exerce.

En ce qui concerne le mécanisme même dont ces protéines induisent l'augmentation de la perméabilité mitochondriale plusieurs hypothèses furent proposées au moins en ce qui concerne la perméabilisation induite par Bax. Parmi ces théories se trouve l'induction de l'ouverture du PTP par Bax via une interaction directe avec des composants de ce complexe. Comme nous l'avons déjà dit le PTP induit un gonflement du compartiment matriciel de la mitochondrie provoquant à terme une rupture de la membrane mitochondriale. Le PTP est composé de protéines de la membrane interne et de la membrane externe comme l'ANT (**A**denine **N**ucleotide **T**ranslocator), le VDAC (**V**oltage **D**ependent **A**nionic **C**hannel), l'hexokinase, la cyclophiline D et le PBR (**P**eripheral **B**enzodiazepin **R**eceptor). Il a notamment été observé que Bax pouvait interagir avec l'ANT (**Marzo *et al*., 1998**). Le problème de ce modèle est qu'il implique une perméabilisation membranaire non spécifique ce qui ne s'accorde pas avec la hiérarchisation précise des évènements suivant cette perméabilisation dont nous avons déjà parlé. En outre une comparaison récente de la perméabilisation mitochondriale induite par l'ouverture du PTP ou par Bax a permis de mettre en évidence que ces deux mécanismes sont strictement distincts (**Pouliquen *et al*., 2006**). Une autre hypothèse implique l'interaction directe de Bax et de Bak avec le VDAC induisant la modulation de celui-ci (**Shimizu *et al*., 1999**). D'après ce

travail Bax induirait une augmentation du niveau de conductance du VDAC permettant le passage du cytochrome c alors que Bcl-x_L induirait la fermeture du VDAC (**Shimizu *et al*., 2000**). Cependant d'autres travaux ont montré que Bax seul est capable d'induire la perméabilisation de membranes artificielles et aucun autre travail n'a jamais validé cette hypothèse. La dernière théorie est celle qui est actuellement prédominante est celle de la formation de pores modulée par le niveau d'oligomérisation de Bax et de Bak. En effet l'état oligomérique de Bax est associé à sa forme insérée dans la mitochondrie (**Gross *et al*., 1998**) (**Antonsson *et al*., 2001**) et à sa capacité à former des canaux dans des membranes artificielles (**Antonsson *et al*., 2000**). A partir de ces informations un transport du cytochrome c dépendant a été reproduit dans des liposomes. Les pores ainsi formés montrent une taille variable dépendante de la concentration en Bax, un dimère de bax induisant la formation d'un pore de 11 Å alors que quatre molécules de Bax conduisent à la formation d'un pore de 22 Å (**Saito *et al*., 2000**). En outre il semble que Bax puisse induire un stress de courbure au niveau de bicouches lipidiques (**Basanez *et al*., 1999**). Cette troisième hypothèse implique donc que bax oligomérisé conduit à la formation de pores lipidiques (**Kuwana *et al*., 2002**) (**Terrones *et al*., 2004**) dont la formation serait principalement dû à l'insertion des hélices Hα5 et Hα6 (**Garcia-Saez *et al*., 2005**).

D. DYNAMIQUE DE LA MORPHOLOGIE MITOCHONDRIALE AU COURS DE L'APOPTOSE

Comme nous l'avons dit précédemment le mécanisme apoptotique implique des changements morphologiques de la mitochondrie. Le premier type de modification observé est le remodelage des crêtes mitochondriales permettant la mobilisation du cytochrome c résultant vraisemblablement de l'action de tBid mais aussi de la perte de la protéine OPA1. En outre nous avons vus que la libération du facteur DDP/TIMM8a lors de la perrméabilisation mitochondriale peut induire une fragmentation mitochondriale en permettant le recrutement du facteur Drp-1. L'intérêt de réaliser une partie traitant de cette fragmentation mitochondriale est que ce phénomène apparaît être régulé lui aussi par les protéines de la famille de Bcl-2 et de plus, les fonctions émergentes des protéines régulant la morphologie mitochondriale en tant que régulateurs potentiels du processus apoptotique montrent que les altérations morphologiques de cet organelle sont importants pour le bon déroulement de la voie intrinsèque de l'apoptose (**Reed & Green, 2002**) (**Karbowski & Youle, 2003**) (**Bossy-Wetzel *et al*., 2003**) (**Scorrano, 2003**) (**Oakes & Korsmeyer, 2004**) (**Scorrano, 2005**) (**Perfettini *et al*., 2005**) (**Heath-Engel & Shore, 2006**). Cependant avant d'en venir à l'implication de la fission mitochondriale dans le processus de mort cellulaire il est nécessaire de rappeler brièvement les informations connues concernant les mécanismes régulant la morphologie mitochondriale.

1. Régulation de la morphologie mitochondriale

Dans les cellules saines les mitochondries sont organisées en un réseau interconnecté qui permet, entre autres choses, une répartition optimale de l'énergie produite ainsi qu'une mobilisation localisée du Ca^{2+} dans la cellule (**Karbowski & Youle, 2003**). Ainsi les mitochondries sont des organites dynamiques dont la morphologie et le nombre changent selon l'état physiologique de la cellule. La configuration d'un tel réseau est régulée par une balance entre des évènements de fission et de fusion membranaires. Ces mécanismes sont cruciaux pour la ségrégation mitochondriale et l'hérédité de l'ADN mitochondrial après division cellulaire (**Hanekamp *et al.*, 2002**) (**Scott *et al.*, 2003**) (**Gorsich & Shaw, 2004**). Dans cette partie nous allons résumer ce qui est connu de la régulation de ces processus de fission et de fusion chez les mammifères.

a. La machinerie de fission mitochondriale

A ce jour deux protéines de mammifères ont été identifiées en tant que régulateurs centraux du mécanisme de fission mitochondriale: hFis1 (**h**uman **Fis**sion **1**) et Drp-1 (**D**ynamin-**r**elated **p**rotein **1**) dont nous avons déjà parlé précédemment (**James *et al.*, 2003**) (**Smirnova *et al.*, 1998**). La protéine hFis1 est une protéine intégrale de la membrane externe mitochondriale ancrée par son domaine C-terminal. Sa surexpression provoque l'apparence d'un réseau mitochondrial très fragmenté et son extinction induit une interconnexion très importante des mitochondries (**Stojanovski *et al.*, 2004**). Le processus de scission est essentiellement sous le contrôle de Drp-1, protéine cytosolique, qui appartient à la superfamille des dynamines et qui est caractérisé par un domaine d'hydrolyse du GTP et un domaine GED (**G**TPase **e**ffector/assembly **d**omain) tous les deux essentiel dans le processus de fission. La protéine Drp-1 présente un mode de fonctionnement similaire aux autres membres de cette superfamille dont le membre le plus connu est la dynamine, protéine impliquée dans le recyclage des vésicules synaptiques. Le domaine GED stimule l'hydrolyse du GTP après assemblage de la dynamine en structures supramoléculaires (**Sever *et al.*, 2000**) (**Praefcke & McMahon, 2004**). Le modèle de scission induit par la dynamine nécessite l'assemblage de celle-ci en oligomères exerçant une force mécanique de constriction de la membrane et initiant ainsi la fission de celle-ci (**Hinshaw, 2000**). Ainsi il a été observé que Drp-1 se relocalise vers la mitochondrie où les oligomères de Drp-1 s'assemble alors sous forme d'anneau initiant le mécanisme de fission membranaire (**Smirnova *et al.*, 2001**) (**Zhang & Hinshaw, 2001**) (**Yoon *et al.*, 2001**) (**Zhu *et al.*, 2004**). L'association de Drp-1 avec la mitochondrie nécessite une interaction de Drp-1 avec hFis1(**Yoon *et al.*, 2003**) formant ainsi des sites de scission (figure 5). En outre ce type de fonctionnement semble impliquer le recrutement de cofacteurs par la forme de Drp-1 liée au GTP comme c'est le cas général pour d'autres GTPases (**Shaw & Nunnari, 2002**). Parmi ces cofacteurs on peut citer la petite protéine G Rab32 qui régule ce mécanisme de fission (**Alto *et al.*, 2002**). Une autre protéine candidate peut être l'endophiline B1 qui joue un rôle dans la morphologie mitochondriale (**Karbowski *et al.*, 2004a**) notamment en induisant une courbure de membrane au travers son activité fatty acyl transferase (**Schmidt *et al.*, 1999**) (**Farsad *et al.*, 2001**). Malgré ces connaissances il apparaît donc clairement que le fonctionnement de la machinerie de fission mitochondriale reste très peu documenté.

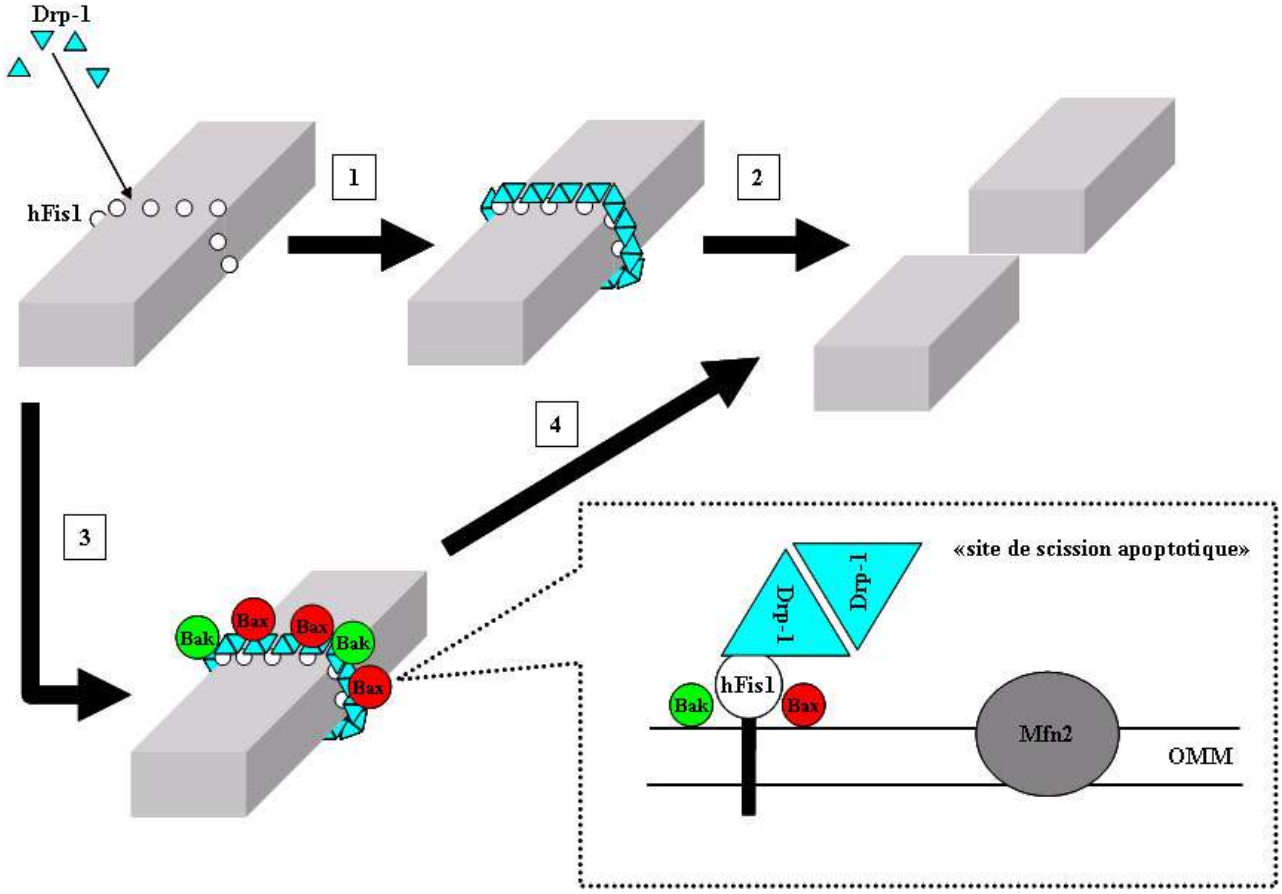


Figure 5: Schéma simplifié du processus de fission mitochondriale. Au sein de cellules saines la protéine Drp-1 est recrutée à la mitochondrie (1), suite à un stimulus qui reste encore indéterminé, où il interagit avec hFis1. Suite à cette association Drp-1 s'assemble en oligomères formant ainsi une structure de type anneau qui est supposé stimuler une constriction membranaire aboutissant à la fission membranaire (2). Il est probable que d'autres facteurs soient recrutés avec Drp-1 afin de réaliser ce processus. Lors du mécanisme apoptotique Drp-1 est également recruté à la mitochondrie (par le biais de la libération de TIMM8a) où se forment des « sites de scission apoptotiques » contenant Drp-1 et hFis1 mais dans lesquels on retrouve aussi les protéines Bax et Bak ainsi que la mitofusine 2 (3). Ceci provoque la fragmentation mitochondriale observée au cours du mécanisme apoptotique (4).

b. La machinerie de fusion mitochondriale

Ce mécanisme est lui aussi principalement modulé par des protéines de la superfamille des dynamines. Ces dynamines sont les mitofusines 1 et 2 (Mfn1 et Mfn2) et la protéine OPA1 dont nous avons déjà parlé. Comme nous l'avons précédemment OPA1 est une protéine de la membrane interne (**Olichon *et al.*, 2002**) qui est un organisateur majeur de la structure des cristae (**Olichon *et al.*, 2003**) au même titre qu'une autre protéine, la mitofilline (**John *et al.*, 2005**). Cependant OPA1 joue également un rôle essentiel dans le processus de fusion mitochondriale (**Griparic *et al.*, 2004**). En ce qui concerne les mitofusines ce sont toutes deux des protéines modulant le processus de fusion et également impliquées dans diverses pathologies (**Santel, 2006**). Leurs fonctions ne sont pas pour autant totalement redondantes (**Eura *et al.*, 2003**), fait notamment illustré par leur différence d'activité d'hydrolyse du GTP (**Ishihara *et al.*, 2004**). En outre les MEFs issues de souris Mfn1 KO ou Mfn2 KO (souris non viables) présentent des altérations de morphologie mitochondriale qui sont bien distinctes

mais avec des modifications plus importantes dans le cas des Mfn 1 KO (**Chen *et al.*, 2003**) (**Chen *et al.*, 2005**).

En ce qui concerne le mécanisme de fusion lui-même il apparaît que OPA1 requiert la présence de la mitofusine 1 pour induire la fusion mais pas de la mitofusine 2 (**Cipolat *et al.*, 2004**). Les mitofusines possèdent la capacité de former des interactions homotypiques ou hétérotypiques entre elles (**Santel, 2006**). Récemment il a été observé que la mitofusine 2 semble jouer un rôle de GTPase de signalisation plutôt qu'un rôle dans le mécanisme de fusion lui-même (**Neuspiel *et al.*, 2005**). Ces protéines impliquées dans la fusion mitochondriale sont très conservées au sein des organismes (**Westermann, 2003**) et les homologues de OPA1 et de la mitofusine 1 chez la levure, respectivement mgm1p et Fzo1p, induisent une fusion membranaire selon un mécanisme qui a été décrit en partie. Ce processus nécessite une interaction indirecte entre mgm1 et Fzo1 qui est assurée par l'intermédiaire d'une troisième protéine intégrale de la membrane externe nommée Ugo1 (**Sesaki *et al.*, 2003**). Dans ce cas, la protéine mgm1ancrée dans la membrane interne interagit avec la partie de Ugo1 située dans l'espace intermembranaire, et la protéine de la membrane externe Fzo1 interagit avec la partie cytosolique de Ugo1 (figure 6). Ce lien entre les deux membranes est essentiel pour la fusion. Le modèle courant de fusion implique une première étape de docking de deux mitochondries adjacentes qui est modulée par l'homodimérisation de Fzo1/Mfn1 (**Pfanner *et al.*, 2004**). Les membranes internes peuvent alors fusionner entre elles, cette étape ne nécessitant que de faibles niveaux de GTP alors que la fusion des membranes internes nécessite de hauts niveaux de GTP suggérant que l'activité GTPase des protéines mgm1/OPA1 et Fzo1/Mfn1 soit surtout requise pour les dernières étapes du processus de fusion (**Meeusen *et al.*, 2004**). Il est possible que d'autres cofacteurs soient requis mais ils ne sont pas connus et l'homologue de Ugo1 chez les mammifères n'a pas encore été identifié.

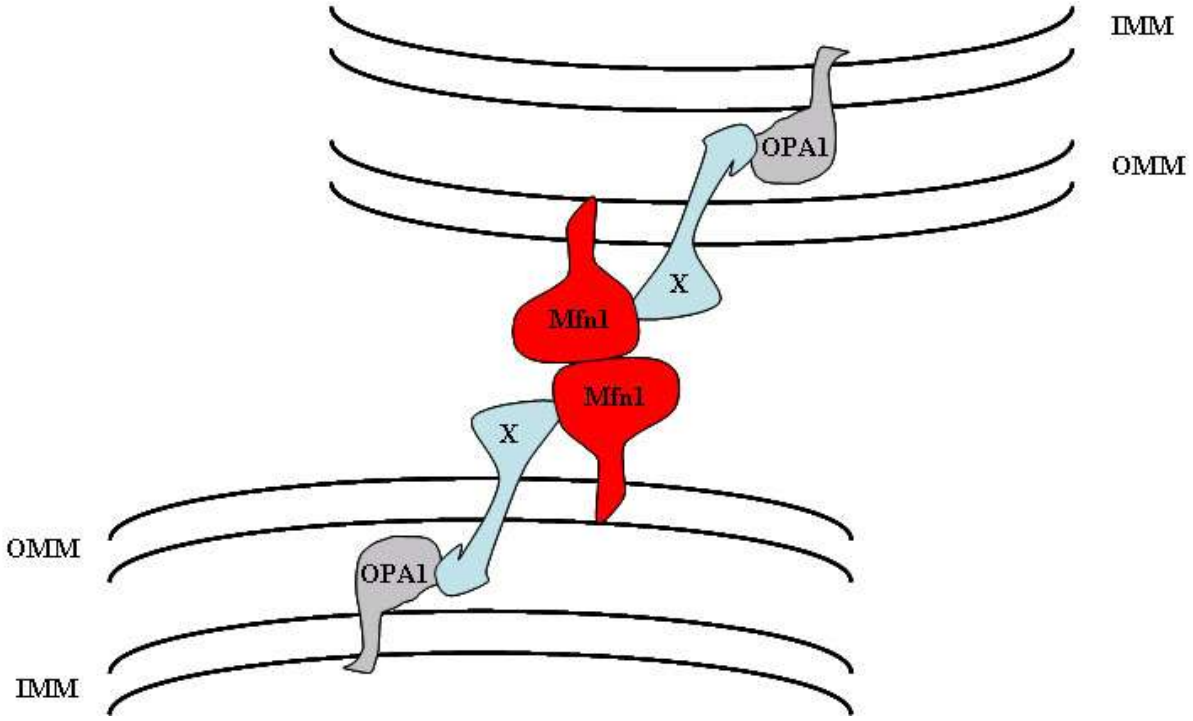


Figure 6: Schéma représentant l'étape de docking de deux mitochondries adjacentes précédent le mécanisme de fusion. La protéine OPA1, située au niveau de la membrane interne (IMM), forme un complexe avec Mfn1, localisée dans la membrane externe (OMM) vraisemblablement par l'intermédiaire d'une protéine inconnue (X) homologue de la protéine Ugo1 de levure. Les mitofusines présentes sur chaque mitochondrie s'assemblent permettant ainsi le rapprochement des mitochondries et l'initiation du processus de fusion.

2. L'apoptose et la fragmentation mitochondriale

a. Implications des protéines de la machinerie de fission/fusion

L'augmentation du niveau de fission mitochondriale a été observé dans plusieurs voies apoptotiques (**Mancini *et al.*, 1997**) (**Desagher & Martinou, 2000**) (**Frank *et al.*, 2001**). Le principal élément de ce mécanisme de fragmentation est la protéine Drp-1 qui, comme nous l'avons vus auparavant, est recruté à la mitochondrie lors du processus apoptotique où il se localise au niveau de sites de scission puis induit la fission mitochondriale et le gonflement mitochondrial (**Frank *et al.*, 2001**). En outre la surexpression du dominant négatif Drp-1^{K38A} inhibe l'apoptose et la fragmentation mitochondriale alors que le swelling mitochondrial est augmenté. A partir de ces résultats l'hypothèse fut émise que Drp-1induisait la mobilisation du cytochrome c en induisant le gonflement de la membrane interne et permettait la formation de vésicules de membrane externe contenant les différents facteurs apoptogéniques libérés lors de l'apoptose. Toutefois ce modèle dans lequel la voie Drp-1 est une voie de libération du cytochrome c ne s'accorde pas avec les aspects cinétiques de libération des différents facteurs apoptogéniques et de plus il a été par la suite observé que la fragmentation mitochondriale ne se produit qu'après la libération de certains facteurs dont le cytochrome c et en aval de la perméabilisation induite par Bax et Bak (**Arnoult *et al.*, 2005b**). Ce

gonflement mitochondrial observé pourrait être plutôt le résultat du remodelage des crêtes mitochondriales permettant la mobilisation du cytochrome c (**Scorrano *et al.*, 2002**).

L'implication d'autres protéines régulant la morphologie mitochondriale a également été rapportée. La protéine hFis1 induit l'apoptose lorsqu'elle est surexprimée (**James *et al.*, 2003**) alors que son absence induit une résistance à l'apoptose et semble inhiber la translocation de Bax (**Lee *et al.*, 2004**). D'un autre côté la surexpression de Fzo1/Mfn inhibe le relargage du cytochrome c alors que l'extinction de son expression sensibilise au processus apoptotique (**Sugioka *et al.*, 2004**). En outre l'absence d'OPA1 augmente également la sensibilité à l'apoptose (**Lee *et al.*, 2004**). Ceci est en accord avec le blocage du processus de fusion observé lors de l'apoptose (**Karbowski *et al.*, 2004b**) et qui peut être attribué à la relocalisation d'OPA1 après la perméabilisation mitochondriale (**Arnoult *et al.*, 2005b**). Ainsi il apparaît que les facteurs impliqués dans le processus de fusion présente une fonction favorisant la survie alors que les facteurs impliqués dans la fission agissent en tant que promoteurs de la mort cellulaire.

b. Rôle des protéines de la famille de Bcl-2

Cette famille de protéines, en plus de son rôle dans la régulation de la perméabilité mitochondrial, semble avoir une influence directe sur le contrôle de la morphologie de cet organite. Par exemple une surexpression de Bax stimule la désintégration du réseau mitochondrial et son domaine BH3 semble être impliqué dans ce phénomène (**Frank *et al.*, 2001**). De même l'expression de Bax dans *trypanosoma brucei* induit la scission de l'unique mitochondrie de cet organisme (**Esseiva *et al.*, 2004**). En outre certains sites mitochondriaux où se localise Bax deviennent par la suite des sites de scission (figure 5) dans lesquels Bax et Bak se trouvent colocalisés avec Drp-1 et Mfn2 (**Karbowski *et al.*, 2002**). La localisation de la mitofusine 2 dans ces sites est intéressante puisqu'il a récemment été montré que son rôle de signalisation pouvait bloquer l'activation de Bax (**Neuspiel *et al.*, 2005**). Une autre protéine impliquée dans la morphologie, l'endophiline B1 aussi connue en tant que Bif-1 (**B**ax-**i**nteracting **f**actor **1**), joue un rôle dans l'activation de Bax. L'extinction de l'expression de Bif-1 retarde l'activation de Bax et de Bak, la libération du cytochrome c et l'activation de la caspase 3 (**Takahashi *et al.*, 2005**).

Un travail récent réalisé a permis de montrer que des protéines de la famille de Bcl-2 du modèle *Caenorhabditis elegans*, CED-9 (homologue du Bcl-2 de mammifère) et Egl-1 (protéine à BH3 unique), étaient capable de réguler la morphologie mitochondriale dans des cellules de mammifères (**Delivani *et al.*, 2006**) suggérant ainsi que la relation entre les protéines de la famille de Bcl-2 et les protéines régulant la morphologie du réseau mitochondrial est un mécanisme conservé au cours de l'évolution. Bien que CED-9 ne bloque pas la perméabilisation induite par Bax il promeut la fusion mitochondriale. La protéine Egl-1 quand à elle induit une fragmentation du réseau mitochondrial similaire à celle qu'il provoque chez *C. elegans* où cette fission est dépendante de Drp-1 (**Jagasia *et al.*, 2005**). En outre pour confirmer ces résultats il apparaît que la surexpression de Bcl-2 induit une augmentation de la complexité structurale et du volume mitochondriaux qui est accord avec un rôle potentiel de Bcl-2 en tant que promoteur du mécanisme de fusion et régulateur de l'organisation des crêtes mitochondriales (**Kowaltowski *et al.*, 2002**). En outre Bcl-2 et Bcl-x_L interagissent avec la

mitofusine 2 confortant ainsi leur rôle dans l'organisation du réseau mitochondrial mais également le rôle de Mfn2 dans l'activation de Bax. Cependant il semble que leur rôle dans la morphologie ne soit pas redondants puisque les morphologies mitochondriales induites par surexpression de Bcl-2 ou de Bcl-x_L sont différentes (**Delivani *et al.*, 2006**).

Bien que l'ensemble de ces résultats restent à un stade encore assez préliminaire ne permettant pas de déterminer les mécanismes précisément mis en jeu, il apparaît de plus en plus évident qu'une régulation croisée des fonctions des protéines de la famille de Bcl-2 et des protéines régissant la morphologie mitochondriale existe et joue un rôle important lors de l'apoptose.

E. IMPORTATION DES PROTEINES DANS LA MITOCHONDRIE

Le nombre de protéines retrouvées au sein de la mitochondrie est à l'heure actuelle estimé à environ un millier de protéines dont une partie seulement a pu être caractérisée au niveau moléculaire (**Taylor** *et al.*, **2003**) (**Sickmann** *et al.*, **2003**) (**Mootha** *et al.*, **2003**). Bien que la mitochondrie possède son propre génome codant pour quelques protéines qui sont exportées et assemblées dans la membrane interne (**Gray** *et al.*, **1999**), cela implique donc l'existence d'une machinerie d'importation protéique essentielle au bon fonctionnement de cet organelle. La mitochondrie étant un organite à double membrane quatre compartiments sont susceptibles de recevoir les protéines traduites dans le cytosol: la membrane externe, l'espace intermembranaire, la membrane interne et la matrice. Afin d'assurer une localisation correcte des protéines mitochondriales codées par des gènes nucléaires, la mitochondrie dispose donc d'une machinerie protéique dédiée à l'importation, l'adressage dans le compartiment concerné et l'assemblage de ces protéines mitochondriales. Il existe donc des systèmes de translocation des précurseurs protéiques importés : Le complexe TOM (**T**ranslocase of the **O**uter **M**embrane) sur la membrane externe et les complexes TIM22 et TIM23 (**T**ranslocase of the **I**nner **M**embrane) sur la membrane interne (**Pfanner & Wiedemann, 2002**). En outre se trouve sur chacune des membranes mitochondriales un appareillage impliqué dans le transfert horizontale et dans l'assemblage membranaire des protéines importées : sur les membranes externe et interne se trouvent respectivement le complexe SAM (**S**orting and **A**ssembly **M**achinery) et le complexe PAM (**P**resequence translocase-**A**ssociated **M**otor), tous deux fonctionnant étroitement avec les translocases citées auparavant (**Wiedemann** *et al.*, **2004**). Il faut également noter la présence de protéines chaperonnes dans le cytosol et dans l'espace intermembranaire intervenant dans la prise en charge des précurseurs protéiques importés et prévenant leur agrégation. Ici nous ne traiterons que des complexes TOM et SAM associés à la membrane externe mitochondriale et dont le rôle sera important dans les chapitres suivants.

1. Adressage des protéines mitochondriales

Les précurseurs protéiques importés au niveau de la mitochondrie possèdent une séquence signale appelée préséquence d'adressage mitochondriale. Le plus souvent cette séquence se situe en N-terminal de la protéine (**Neupert, 1997**) (**Pfanner** *et al.***, 1997**) (**Pfanner, 2000**) et se caractérise par une face chargée positivement tandis que l'autre face est hydrophobe (**Abe** *et al.***, 2000**). Cette séquence est ensuite généralement clivée par des peptidases de l'espace intermebranaire ou matricielles selon la localisation finale de la protéine (**Gakh** *et al.***, 2002**). Cependant il existe un certain nombre d'exemples de précurseurs ne possédant pas de séquence signal clivable mais dont l'information d'adressage se situe dans la séquence de la protéine mature. Parmi ces exemples on trouve notamment des protéines de la membrane externe possédant un domaine transmembranaire situé en position N ou C-terminal pour lesquelles l'information constituant le signal d'adressage est contenu dans ce domaine et à proximité (**Wattenberg & Lithgow, 2001**) (**Waizenegger** *et al.***, 2003**). Enfin pour d'autres protéines de la membrane interne on trouve également des séquences localisées dans le cœur même de la séquence du polypeptide importée (**Brix** *et al.***, 1999**).

2. Translocation des protéines de la membrane externe : le complexe TOM

Dans un premier temps les préprotéines importées sont prises en charges au niveau de la membrane externe par le complexe TOM (figure 7). Ce système protéique est composé de sept sous-unités et existe sous la forme d'un complexe stable d'environ 400kDa (**Dekker** *et al.***, 1996**). Ces différentes sous unités peuvent être classées en trois catégories selon leur fonction au sein du complexe : les récepteurs Tom20, Tom22 et Tom70; la protéine canal Tom40 et les petites protéines Tom5, Tom6 et Tom7. L'essentiel des travaux sur le complexe TOM a été réalisé chez *Saccharomyces cerevisiae* et *Neurospora crassa*. Cependant les homologues de ces protéines sont connus chez les mammifères où le fonctionnement du complexe apparaît être très conservé au sein de ces différents organismes (**Hoogenraad** *et al.***, 2002**).

Parmi les composantes de ce complexe on trouve les récepteurs Tom20, Tom22 et Tom70. Tom20 est ancré dans la membrane externe via un domaine transmembranaire N-terminal. Il interagit préférentiellement avec les précurseurs possédant une préséquence N-terminale qui sont ensuite pris en charge par Tom22 (**Komiya** *et al.***, 1998**). Le récepteur Tom70 existe sous la forme d'un dimère et reconnaît les précurseurs possédant une séquence signale interne (**Brix** *et al.***, 1999**). En ce qui concerne Tom22 c'est un récepteur multifonctionnel car il agit à la fois comme récepteur et comme organisateur du complexe TOM (**van Wilpe** *et al.***, 1999**). Tom22 possède un domaine N-terminal cytosolique et un domaine transmembranaire C-terminal (**Lithgow** *et al.***, 1994**). Tom22 est un point de convergence des préprotéines qui interagissent initialement avec Tom20 ou Tom70 lors de l'étape de translocation au travers de la membrane externe (**Ryan** *et al.***, 1999**). En plus d'intervenir en tant que récepteur, Tom22, via son domaine transmembranaire, permet de maintenir l'association entre

les sous-unités Tom40 du complexe et semble même réguler les évènements d'ouverture et de fermeture du canal (**van Wilpe** *et al.***, 1999**). En outre, à leur fonction de récepteur il faut également souligner que ces trois protéines agissent également en tant que chaperonnes permettant de garder les préprotéines dans un état non replié et évitant ainsi l'agrégation de celles-ci (**Young** *et al.***, 2003**) (**Yano** *et al.***, 2004**).

Le cœur du complexe est constitué par la protéine Tom40 qui forme le pore de translocation au travers duquel passent les précurseurs protéiques importés. Tom40 est l'élément central du **G**eneral **I**mport **P**ore (GIP). Tom40 présente une structure en tonneau β contenant huit brins membranaires. Sa reconstitution dans des vésicules lipidiques a permis de mettre en évidence que le Tom40 forme un canal cationique d'environ 22 Å de diamètre (**Hill** *et al.***, 1998**). En outre des expériences de microscopie électronique et de reconstruction d'image ont permis de mettre en évidence que le complexe forme une structure de 138 Å contenant au moins deus pores de 20 Å de diamètre (**Kunkele** *et al.***, 1998**) (**Ahting** *et al.***, 2001**). Le modèle proposé actuellement implique qu'un canal est donc formé par deux molécules de Tom40 et qu'un complexe TOM est lui constitué de deux à trois canaux (**Kunkele** *et al.***, 1998**) (**Model** *et al.***, 2002**). La protéine Tom40 ne forme pas un pore passif au travers duquel passeraient les préprotéines mais interagit physiquement avec le précurseur déplié au cours de son importation prévenant ainsi son agrégation (**Esaki** *et al.***, 2003**). Tom40 joue donc lui aussi un rôle de chaperonne guidant activement les protéines mitochondriales lors de leur importation.

En ce qui concerne les trois derniers composants de ce complexe il s'agit de petites protéines TOM qui coordonnent la dynamique du canal d'importation. Tom5 interagit directement avec le précurseur et permet son transfert entre les récepteurs et le pore de translocation (**Dietmeier** *et al.***, 1997**). Tom6 et Tom7 interviennent dans l'assemblage et le désassemblage du complexe TOM lors de l'importation d'un précurseur protéique. Tom6 favorise l'interaction entre le complexe TOM et les récepteurs Tom20 et Tom70 (**Alconada** *et al.***, 1995**) et permet de également de stabiliser l'association de Tom22 avec Tom40 (**Dekker** *et al.***, 1998**). Enfin Tom7 agit en antagoniste de la fonction de Tom6 en favorisant la dissociation de Tom40 et des récepteurs Tom20 et Tom22 (**Honlinger** *et al.***, 1996**).

Il faut enfin noter que le complexe TOM est une structure qui évolue de façon très dynamique au cours de la translocation d'un précurseur protéique destiné à être assemblé dans la membrane externe mitochondriale. Ceci se traduit par des changements d'état du complexe en fonction du site d'interaction de la protéine importée avec les différents composants du complexes TOM (**Rapaport** *et al.***, 1998**).

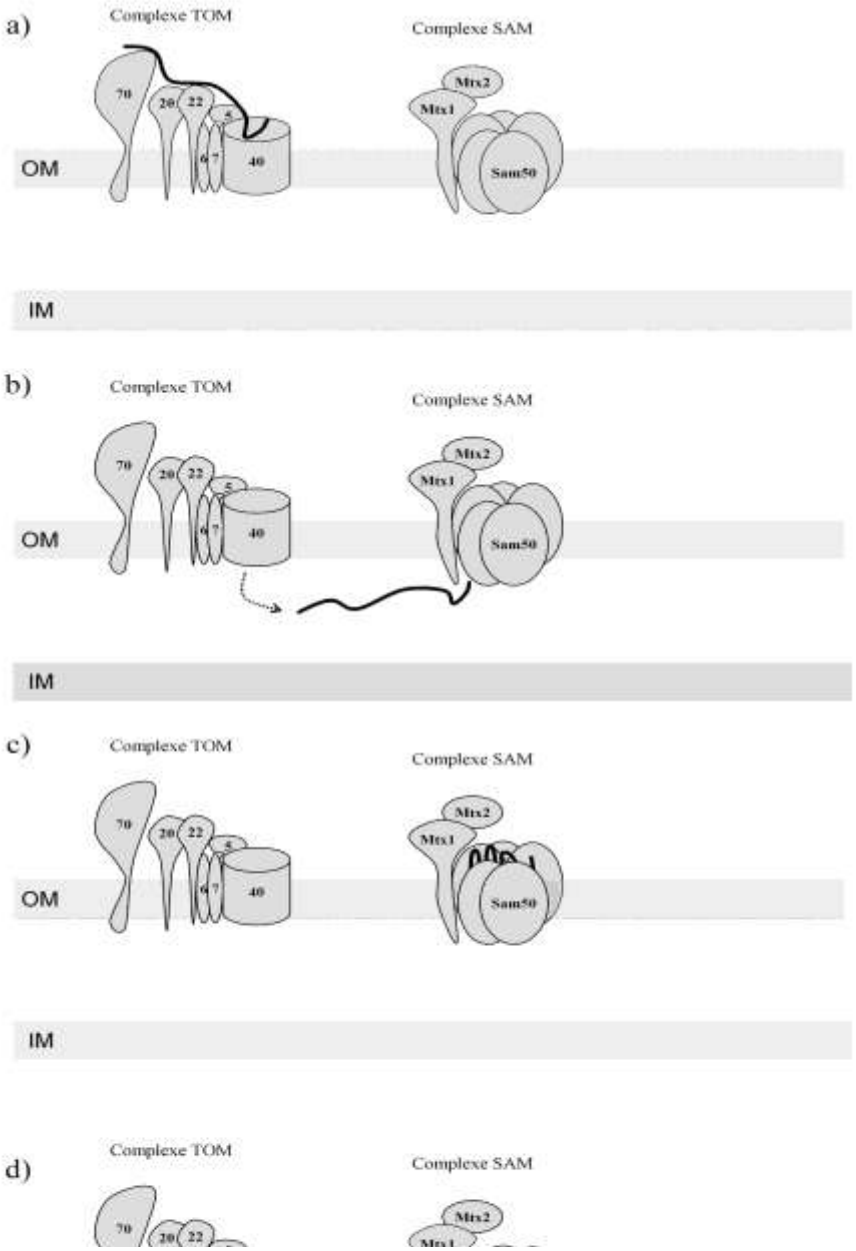


Figure 7: La machinerie d'importation de la membrane externe mitochondriale. a) les précurseurs importés sont reconnus via leur signal d'adressage par les récepteurs Tom70, Tom 20 et Tom22 du complexe TOM. b) les précurseurs à structures complexes telles que Tom40 ou VDAC transitent par le pore d'importation général puis sont pris en charge par le complexe SAM qui assure leur assemblage dans la membrane externe. c) le précurseur est alors replié dans une conformation adéquate au sein de la « cage » formé par les sous-unités Sam50. d) le précurseur ainsi assemblé est alors près à être intégré dans la membrane externe.

Assemblage des protéines dans la membrane externe : le complexe SAM

Jusqu'à dernièrement il était communément admis que le complexe TOM avait pour rôle non seulement la translocation des protéines importées dans la mitochondrie mais était également en charge du transfert horizontal et de l'assemblage des précurseurs adressée à la membrane externe. Cependant récemment il a été montré l'existence d'un complexe, le complexe SAM, chargé du transfert horizontal et de l'assemblage des précurseurs protéiques de topologie complexe comme les

protéines en tonneau β que sont Tom40, VDAC et Mdm10. A ce jour on connaît au moins cinq protéines impliquées dans la fonction de ce complexe chez la levure: Mas37, Sam35, Sam50/Tob55, Mim1/Tom13 et Mdm10. Là encore cette machinerie est une structure très dynamique : pour exemple des études sur l'assemblage de Tom40 montrent que ce dernier passe par deux complexes SAM intermédiaires (**Wiedemann** *et al.***, 2003**) (**Paschen** *et al.***, 2003**). Le premier complexe, SAM I, est un assemblage protéique de 250 kDa prenant en charge le précurseur Tom40 au sortir du complexe TOM et probablement important pour l'insertion membranaire de ce dernier. SAM I est constitué du précurseur importé ainsi que de Mas37, Sam35 et Sam50. Un second complexe de 100 kDa environ, le SAM II, semble être un intermédiaire non mature du complexe TOM nécessitant quelque(s) étape(s) finale(s) d'assemblage avec les autres protéines Tom pour former un complexe TOM mature.

Mas37 fut initialement décrit comme un récepteur de préprotéine impliqué dans l'importation (**Gratzer** *et al.***, 1995**). Mas37 est inséré dans la membrane via un domaine transmembranaire C-terminal et interagit avec Sam50. Le cœur même du complexe est constitué par une protéine formant elle-même un tonneau β dans la membrane externe: c'est la protéine Sam50/Tob55, homologue de la protéine bactérienne Omp85 appuyant ainsi le fait que cette voie est restée très conservé au cours de l'évolution (**Paschen** *et al.***, 2003**). Après Tom40, Sam50 est la seconde protéine de la membrane externe mitochondriale a avoir été décrite comme étant essentielle pour la viabilité et la biogenèse des protéines de type tonneau β (**Kozjak** *et al.***, 2003**). Un Sam50 recombinant s'assemble sous la forme d'une large structure en anneau ayant un diamètre externe de 15 nm et un diamètre interne de 7 à 8 nm (**Paschen** *et al.***, 2003**). En outre l'étude de Paschen *et al.* montre que Sam50 s'insert spontanément dans une bicouche lipidique dans laquelle il génère l'apparition d'un canal présentant une très large conductance de l'ordre de 3,5 à 4 nS. Le modèle proposé pour l'insertion des protéines de structure complexe importées dans la membrane externe implique que la structure annulaire formée par Sam50 formerait une sorte de cage dans laquelle les feuillets β du précurseur pourraient adopter une conformation native ou presque avant d'être intégré dans la membrane (figure 7). La dernière sous-unité Sam35 est une protéine périphérique essentielle pour la viabilité et joue un rôle prépondérant avec Sam50 dans la formation du complexe intermédiaire SAM I (**Milenkovic** *et al.***, 2004**).

En ce qui concerne la protéine Mdm10 (**M**itochondrial **d**istribution and **m**orphology) elle fut d'abord identifiée lors d'un criblage génétique de mutants de levure présentant des altérations de morphologie mitochondriale. Il semblerait que Mdm10 puisse jouer un rôle dans l'interaction de la mitochondrie avec le cytosquelette (**Boldogh** *et al.***, 1998**). Récemment il a été démontré que cette protéine joue un rôle dans les étapes tardives d'assemblage du complexe TOM en favorisant l'association de Tom40 avec Tom22, Tom6 et Tom7 (**Meisinger** *et al.***, 2004**). Enfin Mim1, une petite protéine intégrale de la membrane externe, joue elle aussi un rôle essentiel dans l'assemblage final du complexe TOM (**Waizenegger** *et al.***, 2005**). En outre, le lien moléculaire entre les fonctions des complexes TOM et SAM pourrait être Tom7 qui promeut la ségrégation de Mdm10 et du corps du complexe SAM (formé par Mas37, Sam35 et Sam50) lors de la biogenèse de Tom40 et de la porine mitochondriale (**Meisinger** *et al.***, 2006**).

Des homologues des protéines constituant le cœur du complexe SAM sont connus chez la souris et chez l'homme. Le Sam50 humain a été découvert en même temps que l'identification d'un complexe SAM humain (**Humphries** *et al.***, 2005**). L'homologue de Mas37 est également connu chez la souris et l'homme puisqu'il s'agit d'une protéine appelée metaxine 1. La metaxine fut identifié initialement en tentant d'établir un modèle murin pour la maladie de Gaucher, une maladie lysosomale due à une déficience enzymatique de la glucocérébrosidase, et apparaît être une protéine essentielle dans le développement embryonnaire précoce de la souris (**Bornstein** *et al.***, 1995**). Le gène codant pour la metaxine 1 est situé dans une région chromosomique riche en gènes, dont les gènes codant pour la glucocérébrosidase et la thrombospondine 3, et des altérations du gène de la metaxine 1 sont souvent associées aux recombinaisons chromosomiques impliquées dans la maladie de Gaucher (**Tayebi** *et al.***, 2001**) (**LaMarca** *et al.***, 2004**). Bien que son rôle dans le complexe SAM de mammifère ne soit pas démontré, des investigations sur le rôle de cette protéine ont pu mettre en évidence que c'est une protéine de la membrane externe mitochondriale possédant un domaine transmembranaire C-terminal, homologue de Mas37, et jouant un rôle évident dans l'importation des protéines (**Armstrong** *et al.***, 1997**) (**Abdul** *et al.***, 2000**). Enfin la metaxine 2 est reconnue comme étant l'homologue de Sam35 et a été décrite en tant que protéine périphérique localisée sur la face cytosolique de la membrane externe mitochondriale et interagissant avec la metaxine 1 (**Armstrong** *et al.***, 1999**).

F. PROBLEMATIQUE

Comme nous l'avons vu dans les parties précédentes, l'augmentation de perméabilité de la membrane externe au cours de l'apoptose est induite par les protéines pro-apoptotiques effectrices Bax et Bak. Bien qu'une théorie globale de leur mode de fonctionnement semble indiquer que l'homo-oligomérisation de Bax et/ou de Bak génère la formation de pores, il reste un certain nombre de points à éclaircir afin de parfaire cette théorie et de mieux connaître les mécanismes moléculaires sous-jacents. Le but du travail présenté ici fut de mettre en évidence des étapes précoces de la perméabilisation mitochondriale induite Bax et Bak notamment en recherchant des partenaires protéiques mitochondriaux potentiels de ces deux protéines autres que des protéines de la famille de Bcl-2. La mise en évidence de ces étapes permettra ainsi de mieux appréhender le mode de fonctionnement de ces protéines et sa régulation fine au niveau de la membrane externe de la mitochondrie.

MATERIEL ET METHODES

A. BIOLOGIE MOLECULAIRE

1. Construction des vecteurs d'expression de siRNA

Ce travail a été réalisé en utilisant le kit p*Silencer* hygro siRNA Expression Vector (Ambion) afin de construire des vecteurs d'expression générant des shRNA utilisés par la suite pour obtenir des modèles cellulaires dont l'expression des protéines metaxine 1, metaxine 2 ou Tom22 est diminuée.

Dans un premier temps les séquences des siRNA ciblant les ARN messagers d'intérêt et les séquences oligonucléotiques à synthétiser pour la construction des vecteurs sont déterminées à l'aide du logiciel siRNA Design Tool (Ambion). Pour chaque protéine dont on veut abolir l'expression 3 siRNA sont réalisés. Les séquences ainsi établies sont répertoriées dans le tableau 1.

Pour un insert chacun des deux oligonucléotides, sens et antisens, est dilué à une concentration de 1 µg/µL. Puis ils sont appariés afin de former l'insert; cette réaction d'annealing se fait dans un volume de 25 µL comprenant 1 µL d'oligonucléotide sens, 1 µL d'oligonucléotide antisens et 23 µL de 1X DNA Annealing Solution. Après avoir été chauffé à 90°C pendant 3 minutes la réaction est lentement refroidie à 37°C puis incubée 1 heure. L'insert est ensuite dilué au 1/10^{è} pour la réaction de ligation qui est réalisé dans un volume final de 10 µL comprenant 1 µL d'insert, 1 µL de 10X T4 DNA Ligase Buffer, 1 µL de vecteur linéarisé p*Silencer*™ 3.1-H1 hygro, 1 µL de T4 DNA ligase (5 U/µl) et 6 µL H_2O. La ligation est réalisée à 16°C sur la nuit.

2. Transformation de bactéries

Les bactéries utilisées pour l'étape de transformation sont la souche *E.coli* XL-1 Blue (souche résistante à la tétracycline). La veille de la transformation une culture de bactéries XL-1 Blue est lancée dans 3 mL de milieu LB liquide supplémenté en tétracycline à 10 µg/mL (Luria Bertani : tryptone 1% ; extrait de levure 0,5% ; NaCl 1% ; pH 7,0), cette culture est laissée sur la nuit sous agitation à 37°C. Le lendemain 200 µL du starter de culture sont prélevés et additionnés à 10 mL de milieu LB puis cette culture est à nouveau placée à 37°C sous agitation pendant 2 à 3 heures. Pour une transformation 1 mL de suspension bactérienne est centrifugé à 5 minutes à 6500 rpm. Le culot bactérien est repris dans 100 µL de TSS (pour 10 mL: milieu LB 0,5% DMSO, 1 g PolyEthylène Glycol 6000, 0.125 g $MgSO_4$), mélangé à 0,5µg de plasmide ou 10 µL de produit de ligation, et placé sur glace pendant 30 minutes. Un choc thermique est ensuite réalisé en plaçant les bactéries 2 minutes dans un bain-marie à 42°C puis en le replaçant immédiatement sur glace. Les bactéries sont ensuite additionnées à 900 µL de milieu SOC (tryptone 2%, extrait de levure 0,5%, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM $MgSO_4$, 10 $MgCl_2$, 10 mM glucose) puis incubée 1 heure à 37°C sous agitation avant d'être ensemencées en boîte de Petri sur un milieu solide LB-agar complémenté avec l'antibiotique correspondant au gène de résistance du plasmide utilisé. Les bactéries sont alors incubées sur la nuit

à 37°C pour obtenir des clones bactériens qui seront ensuite analysés après extraction de l'ADN plasmidque.

3. Production de plasmides

Les bactéries *E.coli* XL-1 blue sont cultivées en milieu LB en présence de l'antibiotique correspondant au gène de résistance spécifique du plasmide avec lequel les bactéries ont été transformées. L'extraction d'ADN plasmidique est réalisée avec le kit QIAprep® Spin Miniprep (Qiagen) pour l'analyse du plasmide par digestion de restriction ou le kit Plasmid MidiKit (Qiagen) pour la production en quantité importante et de meilleure qualité pour l'utilisation dans les protocoles de transfection cellulaire ou synthèse *in vitro* de protéines. Ce sont des protocoles de purification sur colonne réalisés selon les indications précises du fournisseur. En général 2 mL de culture bactérienne sont utilisés pour la réalisation de Miniprep et 100 mL pour la réalisation de Midiprep.

4. Vérification des plasmides par digestion de restriction

Les enzymes de restriction utilisées sont les enzymes NEB (New England Biolabs). En général on réalise deux doubles digestions différentes pour vérifier si le plasmide purifié est celui que l'on attend. Une double digestion de restriction est réalisée dans un volume de 10 µL: 1 µg de plasmide, 1 µL d'enzyme A, 1 µL d'enzyme B, 1 µL de tampon optimal pour l'activité des deux enzymes, H_2O qsp 10 µL. La réaction est ensuite incubée 90 minutes à 37°C. Le plasmide ainsi digéré est ensuite analysé par séparation électrophorétique sur gel d'agarose. Les combinaisons d'enzymes de restriction utilisées pour les plasmides pSilencer sont: BamHI/EcoRI et HindIII/EcoRI.

B. CULTURE CELLULAIRE

1. Cellules

Les cultures cellulaires utilisées pour cette étude sont les GBM44 (culture primaire de glioblastome), la lignée Du145 (carcinome de prostate) et la lignée HeLa (carcinome cervical). Les GBM 44 et les HeLa sont cultivées dans un milieu RPMI-1640 (Sigma) supplémenté avec 100 U/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine (solution penicillin 10000 U/mL, streptomycin 10 mg/mL, Sigma), 2 mM de L-glutamine (solution L-glutamine 200 mM, Sigma) et 10% de sérum de veau fœtal (Biowest). La lignée Du145 est cultivé en milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM 4500 mg/L glucose, Sigma) supplémenté de la même façon que pour le milieu RPMI-1640. Les cellules sont cultivées à 37°C en atmosphère 5% CO_2.

A partir de ces trois lignées de bases d'autres modèles cellulaires ont été construits, ils sont décrits dans le tableau 2. Ces cellules sont cultivées dans les mêmes conditions que les lignées

d'origine à l'exception des modèles transfectés avec les antisens Tom20 et Tom22 dont le milieu est supplémenté avec 3% de glucose.

GBM44	Du145	HeLa
GBM44	Du145	HeLa
GBM44 AS-Tom22	Du145 shRNA ScrH	HeLa shRNA ScrH
GBM44 AS-Tom20	Du145 shRNA Mtx1	HeLa shRNA Mtx1
GBM44 AS-Mtx1		HeLa shRNA Tom22
GBM44 AS-Mtx2		
GBM44 AS Bak		
GBM44 MtxΔTm/C		

Tableau 1: Lignées cellulaires utilisées au cours de ce travail. Les 3 lignées parentales sont représentées ainsi que les cellules transfectées à partir de celles-ci.

2. Transfection

a. Electroporation

L'électroporateur utilisé est un Gene pulser® II (Bio-Rad). Des cuves à électrodes Gene pulser® cuvette (Bio-Rad) sont utilisées, l'écart des électrodes dans la cuve est de 0,4 cm. Avant toute chose les cuves et le support de cuve de l'électroporateur sont placés dans la glace, au moins 30 minute avant l'électroporation.

Les cellules sont dans un premier temps décollées par traitement avec une solution de trypsine-EDTA (Sigma) puis comptées sur cellule de Mallassez. Après une centrifugation à 800 g pendant 5 minutes, le culot cellulaire est repris dans du milieu RPMI-1640 sans sérum de veau fœtal puis centrifugé à nouveau 5 minutes à 800 g. Les cellules sont ensuite reprises avec le RPMI-1640 sans sérum à une concentration de 1.10^6 cellules/mL. L'électroporation se fait en déposant 1.10^6 cellules dans la cuve à électroporation ainsi que 5 à 10 µg de plasmides (selon la transfection réalisée). Pour les trois lignées GBM44, Du145 et HeLa, les différents réglages de l'électroporateur sont respectivement 200 V et 250 µF, 250 V et 250 µF et enfin 230 V et 1000 µF. Les cellules sont alors soumises à 2 pulsations électriques successives puis remise en milieu de culture complet.

b. Lipofection

Cette transfection est réalisée avec le kit Effectene® transfection reagent (Qiagen). Les cellules sont ensemencées la veille en boîte 60 mm à raison de 250000 cellules par boîtes. Le jour de la transfection le milieu des cellules est changé (4 mL pour une boîte 60 mm). Pour une transfection 1 µg de plasmide est mélangé à 150 µL de tampon EC, permettant le condensation de l'ADN, et 8 µL de Enhancer. Après avoir été homogénéisée la solution est incubée 5 minutes à température ambiante puis 25 µL de réactif Effectene y sont ajoutés. Le mélange est à nouveau incubé 5 à 10 minutes à température ambiante. Les complexes d'ADN ainsi formés sont repris avec 1 mL de milieu de culture puis déposés sur les cellules. Les cellules sont ensuite remises en conditions normales de culture.

3. Sélection des cellules transfectées

Pour chaque électroporation ou lipofection un contrôle est réalisé pour lequel les cellules sont transfectées mais sans aucun plasmide: ces cellules servent de population contrôle de l'efficacité de la sélection. Le début de la sélection se fait 24 heures après la transfection. Les agents de sélection utilisés sont la néomycine, la puromycine et l'hygromycine (voir tableau 1). La néomycine est utilisée à 250 µg/mL, la puromycine à 600 ng/mL et l'hygromycine à 150 µg/mL. Afin d'obtenir des transfectants stables les cellules sont cultivées en présence d'agent de sélection jusqu'à ce que la population contrôle soit totalement morte.

4. Induction de l'apoptose

Plusieurs types de traitements sont utilisés pour induire l'apoptose. Classiquement les protocoles les plus utilisés sont un traitement à 1 µM staurospaurine pendant 24 heures ou à 2 µg/mL doxorubicine pendant 24 heures.

C. TECHNIQUES D'ISOLATION DE MITOCHONDRIES

1. Fractionnement subcellulaire

Pour obtenir un rendement correcte il faut partir d'au moins 20 boîtes de Petri 100 mm (Flacon) à 80/90% de confluence. Les cellules sont grattées puis centrifugée à 750 g pendant 5 minutes. Les cellules sont lavées deux fois supplémentaires dans 10 mL puis 1 mL de PBS et toujours centrifugées 5 minutes à 4°C. Le culot cellulaire est repris dans un volume de tampon CEB (250 mM sucrose, 50 mM Hepes pH 7,5, 50 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 µM cytochalasine B, 1 mM PMSF). Les cellules sont incubées 30 minutes sur glace puis cassées mécaniquement à l'aide d'un piston et d'un potter en verre de 2 mL (faire 50 allers-retours pour bien broyer les cellules). Après une première centrifugation (750 g, 5 minutes) permettant d'éliminer les

gros débris et les cellules non broyées le surnageant est récupéré puis centrifugé 15 minutes à 13000 g (4°C). Le culot récupérer correspond aux mitochondries, le surnageant subit alors une ultracentrifugation à 100000 g 30 minutes permettant isoler la fraction cytosolique.

2. Purification de mitochondries de foie de rat BDIX

Toutes les opérations sont effectuées à 4°C (sur glace ou en chambre froide). Après avoie prélevé le foie d'un rat BDIX (environ 20g), ce dernier est découpé en morceaux puis broyé et homogénéiser dans 40 mL de tampon 300 mM sucrose, 10 mM Hepès à l'aide d'un piston en téflon tournant à 1000 tours/min (20 aller-retours). L'homogénat est ensuite centrifugé 10 minutes à 4°C à 1200 g. Le surnageant est à nouveau centrifugé selon les même conditions afin d'éliminer totalement tous les gros débris. Le surnageant est repris dans 50 mL de tampon sucrose-Hepès puis centrifugé 10 minutes à 4°C à 8700 g afin de récupérer la fraction mitochondriale. Le culot est décollé avec un piston en téflon puis homogénéiser dans 100 mL de tampon sucrose-Hepès supplémenté avec 1 mM PMSF. L'homogénat mitochondrial est ensuite centrifugé 10 minutes à 4°C à 8700 g. Le culot est repris dans 50 mL de tampon sucrose-Hepès supplémenté en PMSF puis centrifugé à 1000 g 10 minutes à 4°C afin d'éliminer les cristaux de PMSF. Le surnageant est alors à nouveau centrifugé 10 minutes à 4°C à 8700 g et le culot mitochondrial est alors repris dans 2 mL de tampon 0,3 M mannitol, 5 mM MOPS, pH 7,2. Les mitochondries sont alors déposées sur un gradient de Percoll à quatre couches (70%, 30%, 18% et 10%). Les gradients sont centrifugés 35 minutes à 4°C à 13500g. Les mitochondries purifiées sont récupérées à l'interface 70% - 30% à l'aide d'une pipette pasteur puis reprises avec 5 mL de tampon mannitol MOPS et centrifugées 20 minutes à 4°C à 8700 g pour éliminer le percoll. Les mitochondries sont ensuite avec du tampon mannitol MOPS puis dosées par la méthode de Bradford.

D. BIOCHIMIE

1. Extraction de protéines

Pour une culture en boîte de Petri 100 mm (Falcon) les cellules sont grattées dans 3 mL de PBS puis centrifugées 5 minutes à 800 g à 4°C. Le culot est repris avec 100 à 200 µL de PBS selon la taille du culot puis transféré dans un tube eppendorf 1,5 mL puis centrifugé à nouveau 5 minutes à 800 g à 4°C. Le culot est repris dans un tampon de lyse (PBS, 1% Nonidet P40, 0,1% SDS, 0,5% sodium deoxycholate, cocktail d'inhibiteur de protéases Mini (Roche)) à raison de 500 µL pour un culot de 30 mg. Les cellules sont homogénéisées dans le tube eppendorf par 10 allers-retours avec un piston en plastique est incubées sur glace 30 minutes. Les cellules sont à nouveau homogénéisées avec le piston puis centrifugées 15 minutes à 4°C à 16000 g. Puis le surnageant est récupéré puis les protéines sont dosées par la méthode de Bradford avec le réactif Bio-Rad protein assay (Bio-Rad).

2. Electrophorèse et western blot

a. SDS-PAGE

L'analyse par SDS-PAGE (**SDS**-**p**oly**a**crylamide **g**el **e**lectrophoresis) permet de séparer les protéines dénaturées et réduites en fonction de leur taille. Classiquement un échantillon est préparé à partir de 50 µg d'extrait protéique suspendu dans un tampon dénaturant réducteur 2X (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% glycérol, 2% SDS, 10% β-mercaptoéthanol, bleu de bromophénol).

Les échantillons sont chargés sur un gel d'acrylamide/bisacrylamide composé d'un gel de concentration (5% acrylamide/bisacrylamide, 125 mM Tris pH 6,8, 1% SDS, 1% ammonium persulfate, Temed) et d'un gel de séparation dont le pourcentage d'acrylamide est fonction de la taille de la protéine étudiée. (10% acrylamide bis/acrylamide, 375 mM Tris pH 8,8, 1% SDS, 1% ammonium persulfate, Temed).

La migration est réalisée à voltage constant de 200V dans un tampon d'électrophorèse (25 mM Tris, 192 mM glycine, 1% SDS) jusqu'à ce que le front de migration atteigne la limite inférieure du gel.

b. Transfert

Après la migration le gel est rincé 15 minutes dans du tampon de transfert (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% méthanol). Le transfert s'effectue sur une membrane de PVDF (Immobilon P, Millipore) qui a été au préalable traitée au méthanol 30 secondes, rincée à l'eau 1 minute puis équilibrée 15 minutes dans du tampon de transfert. Un appareil de transfert en milieu semi-sec (Semidry blotter 2020, Apelex) est utilisé pour les analyses courantes. Les conditions classiques de transfert pour un gel d'épaisseur 0,75 mm sont les suivantes: voltage constant 10V pendant 30 minutes. Ces conditions peuvent varier selon la taille de la protéine analysée ou l'épaisseur du gel: pour des protéines inférieures à 20 kDa le temps de transfert peut être raccourci pour éviter que les protéines ne traverse la membrane et pour un gel d'épaisseur 1 mm la durée de transfert optimale est de 40 minutes. Pour les protéines de taille supérieure à 75 kDa et plus le transfert en milieu semi-sec ne permet pas un transfert optimal et il est donc préférable de réaliser un transfert en milieu liquide.

c. Western blot

Après le transfert la membrane est saturée dans une solution de PBS, 5% lait pendant une heure à température ambiante sous agitation. Elle est ensuite incubé 1 heure à 37°C avec un anticorps primaire dilué dans une solution de PBS, 1% lait, 0.05% Tween20. La membrane est rincée 3 fois pendant 10 minutes dans la solution de PBS, 1% lait, 0.05% Tween20 avant d'être à nouveau incubé 1 heure à 37°C avec un anticorps secondaire couplé à une peroxydase. Après 3 nouveaux

lavages la révélation par autoradiographie est réalisée par réaction de chimioluminescence (Kit ECL, Amersham). La liste des principaux anticorps utilisés ici est listée dans le tableau 2.

Anticorps anti-	espèce hôte	fournisseur	dilution WB	IP
actine	mouse	Chemincon	1/1000	
cytochrome c	mouse	R&D Systems	1/1000	
Smac/DIABLO	rabbit	ProSci	1/1000	
Bax 2D2	mouse	Sigma	1/1000	
Bax 43-61	rabbit	Dako	1/500	
Bax Δ21	rabbit	Santa Cruz	1/250	
Bak	rabbit	BD Pharmingen	1/1000	2 µL
Bcl-xL	mouse	Transduction Labs	1/500	2 µg
metaxine 1	guinea-pig	P. Bornstein	1/500	2 µL
metaxine 1	mouse	Transduction Labs	1/200	2 µg
metaxine 2	rabbit	P. Bornstein	1/500	2 µL
VDAC2	goat	Santa Cruz		2 µg
Cox IV	mouse	Molecular Probes (Interchim)	1/1000	
Tom22	mouse	Sigma	1/1000	
Tom22	goat	Santa Cruz	1/100	
Tom40	rabbit	Santa Cruz	1/200	
F1-ATPase	mouse	Molecular Probes (Interchim)	1/1000	
PBR	chicken	Sanofi		2 µg
Bid	rabbit	R&D Systems	1/500	

Tableau 2: Liste des principaux anticorps utilisés au cours de ce travail. Les conditions d'utilisation en western blot (WB) et en immunoprécipitations (IP) sont indiquées. Certains de ces anticorps sont aussi utilisés dans les expérimentations de saturation de mitochondries isolées décrites plus loin.

d. Analyse et quantification

La quantification des bandes ainsi révélées est effectuée à l'aide du logiciel IPLabgel (Signal Analytics, Vienne, USA). Les intensités obtenues sont en général rapportées à un contrôle interne (actine pour un extrait total, F1-ATPase ou VDAC pour un extrait mitochondrial).

3. Analyse des complexes mitochondriaux par gel 2D

Cette technique a été mise au point par Hermann Schagger (**Schagger, 2001**). Le principe est de réaliser une électrophorèse en 2 dimensions: la première migration est faite en conditions natives

en utilisant la technique de BN-PAGE (**B**lue **n**ative **p**oly**a**crylamide **g**el **e**lectrophoresis) pour séparer les complexes et la seconde migration est réalisée en conditions dénaturantes classiques (SDS-PAGE) afin de séparer les composantes de ces complexes.

a. Préparation des échantillons

Il faut utiliser des mitochondries isolées fraîchement à partir de cultures cellulaires ou de foie de rat. Après dosage protéique, pour un échantillon donné on part au minimum d'une quantité équivalente à 200 µg de protéines mitochondriales.

Le culot de mitochondries est repris dans un tampon de resuspension (50 mM NaCl, 5 mM 6-aminohexanoic acid, 50 mM imidazole, pH 7.0). Le volume de tampon doit être adéquat pour obtenir une solution à ≈ 10 mg/ml de protéines. Les mitochondries sont ensuite solubilisées en ajoutant de la digitonine (solution stock 10%) de sorte à avoir un rapport mg digitonine/mg protéines égal à 3 (soit 600 µg de digitonine pour 200 µg de protéines). Les mitochondries sont alors incubées 30 minutes sur glace puis l'échantillon est centrifugé 20 minutes à 16000 g à 4°C pour éliminer la fraction non soluble. On ajoute le bleu de coomassie dans l'échantillon (5% bleu de coomassie, 500 mM acide 6-aminohexanoique) de sorte à avoir un ratio mg digitonine/ mg bleu de coomassie égal à 4.

b. Première dimension: BN-PAGE

Le gel de séparation est un gradient d'acrylamide de 5% (5% acrylamide, 25 mM imidazole, 0,5 M acide 6-aminohexanoique pH 7,0, APS 10%, TEMED) à 14% (14% acrylamide, 25 mM imidazole, 0,5 M acide 6-aminohexanoique pH 7,0, glycérol 3,3%, APS 10%, TEMED), ce qui permet une séparation des complexes mitochondriaux de 1000 à 50 kDa. Le gel de concentration est un gel 4% (4% acrylamide, 25 mM imidazole, 0,5 M acide 6-aminohexanoique pH 7,0, APS 10%, TEMED). Les dimensions du montage de gel utilisé sont 14 cm * 22 cm * 1,5 mm. Le gradient est coulé à 4°C et laissé à polymériser à 4°C pendant au moins 2h. Pour la migration 2 tampons sont utilisés: un tampon cathodique (50 mM tricine, 7.5 mM imidazole, 0.002 % bleu de Coomassie, pH 7.0) et un tampon anodique (25 mM imidazole, pH 7.0). La migration est réalisée sur la nuit à 4°C (10 mA, 500 V).

c. Seconde dimension: SDS-PAGE

Après la première migration chaque piste est découpée pour pouvoir être utilisé individuellement pour une seconde migration en conditions dénaturantes. Les pistes qui ne sont pas utilisées immédiatement peuvent être congelées et conservées à -80°C sans que cela n'altère la qualité de l'échantillon, de plus les protéines sont préservées de la dégradation car l'acide 6-aminohexanoique agit également en tant qu'inhibiteur de sérine protéases.

Dans un premier temps les complexes séparés lors de l'étape de BN-PAGE sont dénaturés en plongeant les pistes dans un bain de 1% SDS, 1% β-mercaptoéthanol pendant 2h à température ambiante sous agitation. La piste est ensuite lavée 2 fois 10 min dans un bain 1% SDS pour éliminer le β-mercaptoéthanol qui inhiberait la polymérisation du gel d'acrylamide autour de la bande. La piste

de BN-PAGE est alors insérée dans le montage du gel et sera utilisée comme une partie du gel de concentration. Un gel de séparation à 12% d'acrylamide est utilisé et un gel de concentration 5% est coulé autour de la piste de BN-PAGE. La migration est réalisée sur la nuit à 4°C (50mA, 200V).

d. Transfert et western blot

Le protocole est identique à celui décrit dans le paragraphe 2c.

e. Remarques

→ *Marqueur de poids moléculaires pour BN-PAGE :*

Les marqueurs de poids moléculaire utilisés pour déterminer la taille des complexes protéiques séparés en BN-PAGE sont l'apoferritine (900 kDa et 450 kDa), la thyroglobuline (670 kDa), l'uréase (545 kDa et 272 kDa), la β-amylase (200 kDa) et la BSA (120 kDa et 66 kDa). Lors de la seconde dimension ces protéines migrent comme suit: l'apoferritine donne des bandes de 20 et 22 kDa, la thyroglobuline ne change pas, l'uréase migre a 90 kDa, la β-amylase migre à 56 kDa et la BSA donne une bande à 66 kDa.

→ *Recristallisation de la digitonine :*

Afin d'améliorer la solubilisation des complexes mitochondriaux, il peut être intéressant d'augmenter la pureté de la digitonine commerciale par une double recristallisation. Pour cela on utilise la méthode décrite par Kun *et al.* (**Kun *et al.*, 1979**). Brièvement pour 6 g de digitonine il faut ajouter 150 mL d'éthanol chaud (75°C) puis laisser refroidir sur glace pendant 20 minutes pour que les cristaux précipitent. L'éthanol est ensuite éliminé puis l'opération précédente est recommencée une seconde fois. Les cristaux ainsi obtenus sont ensuite séchés avant d'être utilisés.

4. Immunoprécipitations

Les immunoprécipations sont réalisées à l'aide du Protein G immunoprecitpitation kit (Sigma). Brièvement on utilise au moins 200 µg de protéines pour un extrait mitochondrial ou au moins 500 µg pour un lysat cellulaire total. La quantité de protéine est alors déposée dans une colonne avec la quantité d'anticorps primaire adéquat pour l'analyse (voir tableau 2) puis on complète à 500 µL avec le tampon IP 1X. La colonne est placé sur un agitateur rotatif à 4°C sur la nuit. La résine Protein G-agarose est alors ajouté dans la colonne (30 µL de résine lavé 3 fois avec 1 mL de tampon IP 1X), l'échantillon est à nouveau incubé 6h (ou une nuit) à 4°C sou agitation. Le surnageant est éliminé par centrifugation des colonnes (12000 g, 30 secondes). La résine est ensuite lavée 7 fois avec 500 µL de tampon IP 1X puis une huitième fois avec 500 µL de tampon IP 0,1X. L'élution des protéines se fait en ajoutant 70 µL de tampon dénaturant 2X (le même utilisé pour la préparation des échantillons en

SDS-PAGE) mais sans β-mercaptoéthanol. Les colonnes sont chauffées 5 minutes à 95°C puis centrifugées 1 minute à 12000 g.

5. Cross-linking

a. Cross-linking sur cellules entières

L'agent de pontage utilisé est le DSS (disuccinimidyl subérate), un cross-linker hydrophobe catalysant la formation de liaisons covalentes de 11,4 Å entre deux amines primaires. Une solution stock de DSS 100mM dilué dans du DMSO est préparée juste avant la réaction de cross-linking. Pour une boîte de Petri 100 mm (Falcon) à 80/90% de confluence, les cellules sont grattées puis lavées dans du PBS stérile. Le culot cellulaire est ensuite repris dans 200 µL de tampon de conjugaison PBS, 5 mM DSS. Les cellules sont incubées 30 minutes à température ambiante sous agitation. La réaction de cross-linking est ensuite stoppée par ajout de Tris-HCl 2 M pH 7,5 (20 mM final) et incubation 15 minutes à température ambiante sous agitation. Les cellules sont centrifugées 5 minutes à 800 g puis une extraction de protéines totales est réalisée.

b. Cross-linking sur mitochondries isolées

Le protocole est presque identique que celui utilisé pour les cellules entières. Il faut utiliser au moins 200 µg de protéines mitochondriales. La différence se situe dans le tampon avec lequel est réalisée la réaction qui peut être soit un tampon MIB si ce sont des mitochondries issues d'un fractionnement cellulaire, ou du TRB si les mitochondries ont été utilisées pour des tests acellulaires auparavant. Une lyse avec un tampon Ripa est également nécessaire pour obtenir une meilleure migration lors de l'analyse par électrophorèse et western blot.

6. Peptide Scan

a. Synthèse des peptides dérivés de la séquence de Bax

La séquence de la protéine Bax a été découpée en 91 peptides de douze résidus avec un décalage de séquence de deux acides aminés entre chaque peptide. Les peptides ont été synthétisés puis spotter sur une membrane Amino-PEG_{500}-UC540 par un synthétiseur de peptides MultiPep (Intavis AG, Cologne, Allemagne).

b. Préparation du lysat de mitochondries

Dans un premier temps un lysat de mitochondries issues d'un fractionnement cellulaire est réalisé. Pour cela les mitochondries (2 mg) sont reprises dans un tampon de lyse 50 mM NaCl, 5 mM

acide 6-hexanoique, 50 mM imidazole, CHAPS 1%, pH 7.0, bien homogénéisées puis incubées 30 minutes sur glace. Après une nouvelle homogénéisation le lysat est ensuite centrifugé 15 minutes à 16000 g pour éliminer la fraction insoluble. Le lysat ainsi recueilli est ensuite dilué dans 10 mL de PBS stérile.

c. Révélation des interactions entre les peptides dérivés de la séquence de Bax et des protéines mitochondriales

La membrane est tout d'abord réhydratée dans une solution de PBS puis saturée sous agitation à température ambiante pendant 1 heure dans un bain de PBS, 5% BSA. La membrane est ensuite placée dans un bain avec les 10 mL de lysat mitochondrial réalisé auparavant, l'incubation se fait à 4°C sous agitation sur une nuit. La suite du protocole se déroule comme un western blot classique. La membrane est ensuite rincée rapidement dans du PBS puis incubée avec un anticorps primaire dilué dans du PBS, 1% BSA, 0,05% Tween20 pendant une heure à 37°C. Après 3 lavages de 10 minutes dans du PBS, 1% BSA, 0.05% Tween20 la membrane est incubée à nouveau pendant une heure à 37°C avec un anticorps secondaire. Après trois derniers lavages (2 fois 20 minutes et 1 fois 10 minutes) le résultat est révélé par réaction de chimioluminescence et autoradiographie.

d. Analyse

Chaque spot est quantifié avec le logiciel IPLabgel (Signal Analytics, Vienne, USA) pour obtenir une valeur brut de l'intensité pour chaque peptide dérivé de Bax. Puis les valeurs d'intensité de chaque peptide recouvrant un acide aminé donné sont additionnées puis divisées par le nombre de peptides correspondant afin d'obtenir une valeur de capacité d'interaction de chaque acide aminé de la séquence de Bax avec la protéine mitochondriale analysée.

7. Tests acellulaires sur mitochondries isolées

Ces tests acellulaires sont réalisés pour analyser le mode d'association de protéines radiomarquées sur des mitochondries isolées. En général ce sont les mitochondries de foie de rat BDIX qui sont utilisées mais il est également possible de se servir de mitochondries issues d'un fractionnement subcellulaire. La réaction est faite en tube Eppendorf 1,5 mL dans un volume final de 40 µL de tampon TRB (250 mM sucrose, 80 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM acide malique, 8 mM acide succinique, 1 mM ATP-Mg^{2+}, 20 mM MOPS, pH 7,5) permettant le maintien de la phosphorylation oxydative et facilitant l'importation de protéines. Dans ce volume réactionnel sont présents 100 µg de mitochondries ainsi que 4 fmol de la protéine radiomarquée au ^{35}S que l'on souhaite analyser. Les réactions sont ensuite incubées au bain-marie 1 heure à 30°C. Les mitochondries sont ensuite centrifugées 10 minutes à 4°C à 6000 g. A ce moment le culot peut être récupéré tel quel et repris dans 10 µL de tampon dénaturant réducteur 2X: on parlera alors de test d'association. L'autre solution est de soumettre le culot à un traitement alcalin permettant de vérifier si

la protéine est inséré dans la membrane: cela sera alors un test d'insertion. Pour le traitement alcalin le culot mitochondrial est resuspendu dans 100 µL de tampon carbonate de sodium (300 mM sucrose, 100 mM Na_2CO_3, pH 11,5) et incubé sur glace 30 minutes. Les mitochondries sont à nouveau centrifugées 10 minutes à 4°C à 6000 g puis le culot est repris dans 10 µL de tampon dénaturant réducteur 2X.

Les échantillons sont alors analysés par SDS-PAGE et le gel coloré au bleu de coomassie puis séché et enfin exposé dans une cassette dotée d'un écran au phosphore (Molecular Dynamics) pendant 1 à 2 semaines selon la « fraîcheur » de la ^{35}S-méthinonine utilisée lors de la synthèse de protéines radiomarquées. L'écran est ensuite scanné par un PhosphorImager 445 S1 (Molecular Dynamics) et les bandes correspondant à la protéine analysée sont quantifiées à l'aide du logiciel IPLabgel (Signal Analytics, Vienne, USA).

Dans le cas de tests où est réalisée une compétition entre la protéine radiomarquée et un anticorps dirigé contre une protéine de la membrane externe mitochondriale, les mitochondries sont saturées 30 minutes à 30°C avec l'anticorps avant d'ajouter la protéine marquée à la ^{35}S-méthinonine et de réaliser une nouvelle incubation de 30 minutes à 30°C. Dans le cas d'une compétition entre deux protéines radiomarquées le principe est le même avec une première incubation/saturation avec la protéine compétitrice suivi d'une incubation avec la protéine étudiée.

Il est possible de récupérer le surnageant de ces tests acellulaires, d'y ajouter 10 µg d'extrait cytosolique de cellules saines et de mesurer ainsi la capacité du surnageant récolté à induire l'activité DEVDase de l'extrait cytosolique.

8. Mesure d'activité DEVDase

La mesure de l'activité DEVDase, représentant notamment l'activité protéolytique des caspases 3 et 6, est utilisée en tant que marqueur de l'induction du mécanisme apoptotique. Cette mesure est réalisée à l'aide du kit CaspASE Assay System, Fluorometric (Promega). Les mesures sont réalisées en plaques 96 puits avec un volume réactionnel de 100 µL (32 µL de Caspase Assay Buffer, 2 µL de DMSO, 10 µL de Dithiothréitol à 100mM, 10 µg d'extrait protéique cellulaire, H_2O qsp 98 µL et 2 µL de substrat Ac-DEVD-AMC à 10 mM). Avant d'ajouter le substrat le mélange réactionnel est incubé 30 minutes à 37°C. La fluorescence émise par le substrat clivé (longueur d'onde d'excitation 365 nm, longueur d'onde d'émission 465 nm) est ensuite mesurée toutes les 15 minutes pendant 2 heures à l'aide d'un fluorimètre Fluoroskan Ascent FL (Thermo, Electron Corporation).

L'activité DEVDase spécifique d'un échantillon est définie comme étant le rapport de la pente de la courbe (fluo) = f(temps) sur la quantité de protéines utilisée pour la réaction.

9. Transcription/traduction in vitro de plasmides

a. Synthèse de protéines marquées à la ^{35}S-méthionine

Cette synthèse *in vitro* est réalisé avec le kit TNT® T7/SP6 Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega). La transcription/traduction se fait dans un volume réactionnel de 50 µL (25 µL de lysat de réticulocyte, 2 µL de tampon d'ARN polymérase 25X, 1 µL de mélange d'acides aminés sans méthionine, 1 µL d'inhibiteur de ribonucléase RNasin® (Promega), 20 µCi soit 2 µL de ^{35}S-méthionine (Amersham pharmacia), 1 µL d'ARN polymerase TNT® (T7 ou SP6 selon le plasmide utilisé), 2 µg de plasmides, H_2O qsp 50 µL). La réaction de translation se fait au bain-marie pendant 90 minutes à 30°C.

b. Précipitation au TCA et quantification

Afin de doser la quantité de protéines radiomarquées synthétisées 2 µL de produit de traduction sont dénaturés dans 250 µL de NaOH 1 M et incubés 10 minutes à 37°C. Puis les protéines sont précipitées en ajoutant 1 mL de TCA 25% avant une incubation de 30 minutes sur glace. Le précipité est ensuite récupéré sur des disques de fibre de verre Whatman GF/A imbibés auparavant avec 5 mL de TCA 5 % puis laver 3 fois avec 5 mL de TCA 5 %. En parallèle 2 µL de produit de traduction non précipité ont été déposés sur un autre disque pour avoir une valeur de la radioactivité totale du produit de traduction. Après avoir séché les filtres sous lampe chaque disque est alors placé dans des tubes à scintillation (Beckman) dans lequel sont ajoutés 4 mL de liquide à scintillation. La radioactivité est alors comptée (en cpm) à l'aide du Liquid Scintillation Analyzer TRI-CARB 2100 TR (Packard).

La quantité de protéines traduites ayant incorporées la ^{35}S-méthionine se calcule alors de la façon suivante: quantité de protéines traduites (fmol) = 1000*[(cpm total * 20 (µCi)/cpm précipité)/nombre de méthionine dans la protéine traduite).

10. Purification de protéines His-taggées

Cette purification se fait à partir d'un litre de culture bactérienne. Après avoir centrifugé la culture (4000 g, 15 minutes) le culot bactérien est repris dans le tampon A (6 M chlorure de guanidine, 100 mM NaH_2PO_4, 10 mM Tris, pH 8,0) à raison de 5 mL par gramme de bactéries. Après sonication les bactéries sont agitées 1 heure à 4°C. Le lysat bactérien ainsi préparé est ensuite centrifugé 20 minutes à 10000 g et à 4°C. Le surnageant est ensuite incubé avec 4 mL de résine Ni-NTA (QIAGEN) préalablement équilibré dans du tampon dans du tampon A et ce pendant 1 heure à 4°C sous agitation.

La résine est ensuite récupérée après centrifugation (2000 g, 10 minutes) puis coulée dans une colonne dont le débit est de 10 à 15 mL par heure. La résine est ensuite lavée avec 5 volumes de tampon A, puis 5 volume de tampon B (8 M urée, 100 mM NaH_2PO_4, 10 mM Tris, pH 8,0) et enfin avec du tampon C sur la nuit (8 M urée, 100 mM NaH_2PO_4, 10 mM Tris, pH 6,3). Enfin l'élution est

réalisée avec du tampon C additionné de 250 mM imidazole et une vingtaine de fractions d'environ 2 mL (1 fraction toutes les 250 secondes) sont alors collectées. Puis pour déterminer les fractions dans lesquelles se trouve la protéine purifiée un profil d'élution est réalisé en mesurant la densité optique de chaque fraction à 280 nm. Les fractions correspondant au pic d'élution sont alors poolées puis 2 dialyses successives de 12 heures sont effectuées dans un volume de PBS 1000 fois supérieur au volume d'élution récupérer. Après dosage par la méthode de Bradford la protéine purifiée peut être concentrée en utilisant système de tamisage moléculaire La protéine ainsi purifiée est ensuite analysée sur gel d'acrylamide par coloration au nitrate d'argent et/ou bleu de coomassie ainsi qu'en western blot.

11. Activation de Bax recombinant His-taggé par le pH et séparation des fractions monomériques et oligomériques

La protéine Bax recombinante est activée par le pH par une incubation dans un tampon 300 mM NaCl , 50 mM NaH_2PO_4, pH 6,0 sur glace pendant 90 minutes. Après cette incubation le pH est ajusté à 7,4 par ajout de NaOH puis la solution contenant le Bax recombinant est alors filtré à l'aide d'un tube MicroCon YM 30 (Millipore) contenant une membrane ayant un cut-off de 30000 Daltons. Cette filtration est réalisée par centrifugation du tube MicroCon à 12000g pendant 15 minutes. La fraction ayant traversée la membrane est définie comme étant la fraction monomérique, la fraction supérieure étant la fraction oligomérique. Un contrôle doit être réalisé en filtrant du Bax non traité par le pH afin de séparer les monomères non actifs et une fraction oligomérique contrôle. Cette fraction oligomérique existe même sans traitement préalable à l'activation de Bax. La présence d'une telle fraction peut s'expliquer par un mauvais repliement du Bax purifié lors de la dialyse, entraînant soit une activation partielle du Bax purifié soit la formation d'agrégats protéiques. Le Bax ainsi préparé peut ensuite être utilisé pour des tests acellulaires.

12. Activation de protéines de la famille de Bcl-2 par la chaleur

En général ceci se fait à partir de protéines synthétisées *in vitro* marquées à la ^{35}S-méthionine soit en vue d'une utilisation pour des tests acellulaires soit pour la formation de complexes entre deux protéines suivie d'une analyse par immunoprécipitation. La quantité requise de protéine est prélevée et additionnée de TRB 4X afin de réaliser l'activation de la protéine dans du TRB 1X final ; les 4 fmol de protéine ainsi activée pourront alors être directement incorporés dans le tube réactionnel du test acellulaire. L'étape d'activation se fait en incubant la protéine au bain-marie pendant 1 heure à 43°C.

13. Formation de complexes in vitro entre différentes protéines radiomarquées

Ce type de test est réalisé pour reproduire, dans un contexte soluble, la génération de complexes susceptibles de se former au niveau de la membrane externe mitochondriale: par exemple

il est possible de reproduire les interactions entre une protéine de la famille Bcl-2 préalablement activée et un autre partenaire. Des protéines radiomarquées synthétisées *in vitro* avec le kit TNT® T7/SP6 Coupled Reticulocyte Lysate System (voir 9.1) sont utilisées pour réaliser ce test. Les conditions utilisées sont identiques à celles décrites pour les tests acellulaires sur mitochondries isolées. Les protéines sont présentes en quantité équimolaire (10 fmol de chaque produit de traduction) dans du tampon TRB, le volume réactionnel est de 50 ou 100 µL en fonction des volumes de produit de traduction nécessaires. La réaction se fait au bain-marie à 30°C pendant une heure. Les complexes ainsi formés sont ensuite analysés par immunoprécipitation.

RESULTATS ET DISCUSSIONS P.60

CHAPITRE I : ETAPES PRECOCES DE L'ASSOCIATION DE LA PROTEINE EFFECTRICE PRO-APOPTOTIQUE BAX AVEC LA MEMBRANE EXTERNE DE LA MITOCHONDRIE: MISE EN EVIDENCE D'UN RECEPTEUR MITOCHONDRIAL DE BAX

A. Avant-propos

Parmi les membres pro-apoptotiques à multi-domaines de la famille de Bcl-2, le mécanisme de la mort induite par Bax a été le plus largement étudié. Comme nous l'avons vu en introduction l'action des effecteurs pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2 comme Bax peut se découper en plusieurs étapes: une étape d'activation, une étape de translocation, une étape d'oligomérisation et enfin une étape de perméabilisation.

Rappelons d'abord que la structure RMN de Bax a permis de montrer que celui-ci est une protéine globulaire composée de 9 hélices α dont les hélices Hα5 et Hα6 ainsi que le domaine BH3 sont enfouis dans le coeur de la protéine (**Suzuki *et al*., 2000**). En outre le domaine BH3 est caché par la face hydrophobe de l'hélice Hα9 C-terminale qui expose ainsi ses acides aminés polaires vers le cytosol. En revanche la résolution RMN de Bax révèle que les extrémités N et C-terminales sont des régions présentant une grande mobilité potentielle. Alors qu'en conditions normales Bax est une protéine cytosolique (**Hsu *et al*., 1997**), lors de l'induction de l'apoptose Bax subi un changement de conformation et se relocalise à la mitochondrie où il provoque alors une augmentation de la perméabilité mitochondriale et la libération de facteurs apoptogéniques (**Degenhardt *et al*., 2002**). Cette étape de translocation à la mitochondrie est donc une étape très précoce de l'action de Bax.

Ainsi Bax subit de profonds changements structuraux lors de son activation, ce qui conduit à l'exposition de domaines spécifiques induisant sa localisation mitochondriale et son insertion dans la membrane externe. L'implication de ces différents domaines dans la localisation mitochondriale de Bax a fait l'objet de nombreux débats. L'activation de Bax implique un déploiement de l'Hα9 et un changement de conformation de l'extrémité N-terminale (**Nechushtan *et al*., 1999**). Bien que le domaine C-terminal de Bax fut d'abord décrit comme un domaine d'adressage et d'ancrage transmembranaire comme c'est le cas pour Bcl-2 et Bcl-x_L, des travaux ont montré par la suite que le domaine N-terminal de Bax, composé des 20 premiers résidus de la protéine, est impliqué dans la régulation de l'adressage de Bax à la mitochondrie; ce domaine a donc été appelé séquence **A**poptosis **R**egulating **T**argeting sequence ou ART (**Goping *et al*., 1998**) (**Cartron *et al*., 2002a**). En outre d'autres études ont pu montré que la délétion de l'extrémité C-terminale de Bax n'altère ni la capacité de ce dernier à s'associer avec la mitochondrie ni sa capacité à induire la mort par apoptose (**Tremblais *et al*., 1999**) (**Priault *et al*., 1999**) (**Oliver *et al*., 2000**). Par la suite il a été démontré qu'une séquence située dans la région N-terminale de l'Hα1 de Bax, c'est à dire immédiatement en aval du domaine ART, contient un signal d'adressage mitochondrial (**Cartron *et al*., 2003b**). Ainsi il apparaît clairement que la partie N-terminale de Bax est essentiellement impliquée dans sa localisation mitochondriale et que le déploiement de cette extrémité lors de l'activation de Bax conduit à dévoiler une séquence d'adressage mitochondriale. Ceci est étayé par l'existence d'un variant de Bax appelé BaxΨ dont les 19 premiers résidus sont absents et qui est une forme de Bax constitutivement associée à la membrane externe mitochondriale avec une toxicité plus importante que la forme canonique de Bax. Plus récemment la preuve a été apportée que l'adressage mitochondrial et l'insertion membranaire de Bax sont médiés par des domaines distincts (**Cartron *et***

***al*., 2005**). En effet il apparaît ainsi que l'exposition du domaine ART permet de révéler la séquence d'adressage située dans l'hélice α1 alors que l'extrémité C-terminale contrôle l'exposition des deux hélices hydrophobes Hα5 et Hα6 qui sont les domaines d'insertion membranaire. De plus l'Hα1 est impliquée dans l'activation de Bax via une interaction avec le domaine BH3 de la protéine Bid (**Cartron *et al*., 2004c**).

A la suite de son association avec la membrane externe mitochondriale Bax s'insert alors dans la membrane où il forme des homo-oligomères. Cette aptitude à l'homo-oligomérisation est directement liée à la capacité de Bax à former des pores responsables de l'augmentation de perméabilité de la membrane externe mitochondriale lors du processus apoptotique (**Antonsson *et al*., 1997**).

Bien que les modifications de la conformation de Bax lors de son activation et leur implication dans la translocation à la mitochondrie commencent à être bien décrites, les étapes les plus précoces de cette association mitochondriale restent encore très mal connues. En effet l'existence d'un signal d'adressage mitochondrial dans la séquence de Bax au niveau de l'Hα1 suggère au moins une étape non déterminée de prise en charge de Bax par la membrane externe plutôt qu'une insertion directe via le déploiement des hélices hydrophobes Hα5 et Hα6. En outre une telle prise en charge pourrait impliquer l'existence de complexes intermédiaires précédent l'homo-oligomérisation et la formation de pores dans la membrane externe. Le but du travail ci-après fut de décrypter cette étape d'association la plus précoce en recherchant comment Bax est pris en charge par la mitochondrie et la mise en évidence de complexes protéiques associés à cette étape.

B. Article : mise en évidence de Tom22, un récepteur appartenant au pore de translocation de la membrane externe mitochondriale, en tant que récepteur de la protéine pro-apoptotique Bax

TOM 22, a core component of the mitochondria outer membrane protein translocation pore, is a mitochondrial receptor for the pro-apoptotic protein Bax

Grégory BELLOT[1,2*], Pierre-François CARTRON[1,2*], Lisa OLIVER[1,2], Philippe JUIN[1,2], Lucas C. ARMSTRONG[3], Paul BORNSTEIN[3], Katsuyoshi MIHARA[4], Stephen MANON[5] and François M. VALLETTE[1,2o]

[1] INSERM U601, F-44000 France
[2] Université de Nantes, Faculté de Médecine, 9 Quai Moncousu F-44035 Nantes. Cedex 01 France.
[3] Department of Biochemistry, University of Washington, Seattle, Washington 98195 USA.
[4] Department of Molecular Biology, Graduate School of Medical Science, Kyushu University, Fukuoka 812-8582 Japan.
[5] CNRS UMR 5095, Université Bordeaux 2, 1 rue Camille Saint Saëns F-33077 Bordeaux. France

[*]both authors contributed equally to this work

°Corresponding author

Key words: apoptosis, Bax, mitochondria, TOM, receptor

Abbreviation: C-T: carboxy terminal end; IVT: in vitro translated; N-T: Amino-terminal end; RFP: Red Fluorescence Protein; STS: staurosporine; TOM: translocase of the outer membrane of mitochondria; PBR: peripheral benzodiazepine receptor; VDAC: voltage dependent anionic channel.

SUMMARY

The association of Bax with mitochondria is an essential step in the implementation of apoptosis. By using a bacterial two-hybrid assay and cross-linking strategies, we have identified TOM22, a component of the translocase of the outer mitochondrial membrane (TOM), as the mitochondrial receptor of Bax. Peptide mapping showed that the interaction of Bax with TOM22 involved the first alpha helix of Bax and possibly two central alpha helices which are homologous to the pore forming domains of some toxins. Antibodies directed against TOM22 or an antisense knock-down of the expression of TOM22 specifically inhibited the association of Bax with mitochondria and prevented Bax-dependent apoptosis. In yeast, a haploid strain for TOM 22 exhibited a decreased expression of TOM22 and mitochondrial association of ectopically expressed human Bax. Our data provide a new perspective on the mechanism of association of Bax with mitochondria as it involves a classical import pathway.

INTRODUCTION

Apoptosis is a cell death program, which is central in many aspects to metazoan cell physiology and pathology [1, 2]. Proteins of the Bcl-2 family are key players in the execution phase of apoptosis and their main functions is to control the release of apoptogenic proteins, such as cytochrome c (cyt c) and Apoptosis Inducing Factor (AIF) from the mitochondria [3, 4]. The Bcl-2 family is composed of anti-apoptotic members such as Bcl-2 and pro-apoptotic proteins such as Bax or Bak, which share several domains of homology called BH [1]. In addition to these proteins, a third Bcl-2 related family of proteins have been identified as major amplifiers and/inducers of apoptosis [4]. The latter family has a homology to Bcl-2 limited to the BH3 domain and thus is called the BH3 only proteins [4]. The double knock-out of Bax and Bak renders cells completely resistant to cell death [5-7], highlighting the essential role of these proteins during apoptosis.

The determination of the solution structure of Bax showed its organization around 9 α-helices (Hα1 to Hα9) [8] of which Hα2 contained most of the BH3 domain and Hα5 and Hα6, a putative pore forming domain that has been shown to be involved in the integration of Bax into the membrane [9, 10]. Bax resides in an inactive state in the cytosol in many resting cells and is translocated to the mitochondria at the onset of apoptosis [11]. This translocation is associated with major conformational changes in Bax as both the N- and the C-termini become exposed facilitating its mitochondrial addressing and membrane insertion [10, 12]. Bax mitochondrial membrane insertion and oligomerization is closely associated with the release into the cytosol of several intermembrane space proteins such as cyt c, Smac (second mitochondrial apoptotic factor) and AIF [4, 13]. The nature of the different stimuli involved in the activation or in the inhibition of Bax is still largely unknown although this step remains one of the most critical points of control of the apoptotic program during which therapeutic interventions can be envisaged [4, 14].

The mitochondrial targeting signals of Bcl-2 and Bcl-Xl have been unambiguously assigned to their C-termini (C-T) [15, 16]. However, the situation seems to be more complex for Bax since, despite the homology between the CT of Bcl-2 and Bax, the C-T of Bax,

which encompasses the Hα9, does not have conventional mitochondrial targeting features as it cannot, single-handedly, support the translocation of a reporter protein to the mitochondria [17-19]. However, mutation of specific amino acids or post-translational modifications such as phosphorylation can render this C-T competent for mitochondrial addressing [20]. We have recently shown that Bax contains a functional mitochondrial-addressing signal in its N-T, which encompasses Hα1. Point mutations in the Hα1 of Bax or the over-expression of a chimera protein in which this helix was fused to the cytosolic Red Fluorescence Protein (RFP) inhibited Bax-dependent apoptosis [18].

We have attempted to identify mitochondrial receptors to Bax and found that TOM22, a receptor for nuclear encoded mitochondrial proteins, was a receptor for Bax Hα1. The functional inhibition of this interaction interfered with Bax mitochondrial addressing and apoptosis underlining the importance of this interaction in cell death.

RESULTS

The association of Bax with mitochondria is trypsin sensitive.

Once inserted into the mitochondrial membrane, Bax induced the formation of the so-called mitochondrial membrane permeabilization (MMP) alone or in combination with other proteins and/or lipids [21]. Numerous study have shown that in a simple cell free assay using isolated mitochondria and purified or *in vitro* translated Bax could accurately reproduce early events of the Bax-induced permeabilization of the mitochondria [18, 19, 22-25]. In order to elucidate the receptors involved in Bax association with mitochondria, we subjected isolated mitochondria to a mild proteolysis by trypsin using a protocol described earlier for the identification of components of the outer membrane import machinery [26, 27]. Isolated rat liver mitochondria were treated with 0, 5 or 50 µg/ml trypsin for 30 min at 4°C (see experimental procedures) before immunoblot analyses of selected mitochondrial proteins. As shown in **Fig. 1A**, the treatment of purified rat liver mitochondria for 30 min at 4°C with trypsin (0 to 50 µg/ml), specifically degraded outer

membrane proteins with cytosolic exposed domains such as the peripheral benzodiazepine receptor (PBR), the translocases of the outer membrane, TOM20 and TOM22 but affect neither the voltage dependent anionic channel 1 (VDAC 1), an integral outer membrane protein, intermembrane space proteins such as Smac/Diablo or AIF nor cyt c and F1-ATPase, two inner membrane proteins.

The association of two variants of Bax with mock- and trypsin-treated isolated mitochondria were assayed viz. Bax α, Bax α activated by a preincubation with truncated form of Bid (p13-tBid) [5] and Bax Ψ, a variant, which corresponds to a deletion of the first 19 N-terminal amino acids of Bax α [28]. We also used constructs in which the RFP was fused to two putative mitochondrial targeting signals in Bax (i.e. Hα1 and Hα9) [17, 18]. With respect to the localization of these helices, the Hα1 of Bax was fused at the N-T of the RFP to form a Hα1-RFP construct while Hα9 and a Hα9 mutant containing a single deletion of S184 [17] were fused to the C-T of RFP to form the RFP- Hα9 and RFP- Hα9 ΔS184 constructs.

The proteins were synthesized *in vitro*, labeled with ^{35}S (IVT proteins) and incubated with 50 µg of isolated mock- or trypsin-treated mitochondria and their association with the organelle was assayed by SDS-PAGE and autoradiography analysis of the mitochondrial pellets. Bax α binds poorly to mitochondria in the cell-free assay unless activated by an apoptotic signal from tBid [29]. As shown in **Fig. 1B**, the low binding of Bax α observed in mock-treated mitochondria was completely abolished by a 5 µg/ml trypsin pretreatment. The mitochondrial association of Bax α was considerably enhanced once activated by tBid and its binding was affected only by a 50 µg/ml trypsin pretreatment (**Fig. 1B**). Similarly, the spontaneous association of Bax Ψ was unaffected at 5 µg/ml trypsin but inhibited by a 50 µg/ml trypsin pretreatment (**Fig. 1B**). In addition, the proteolytic pretreatment affected the binding of Hα1-RFP at 50 µg/ml, but not that of RFP-Hα9ΔS184 Bax (**Fig. 1B**) while the RFP-H α 9 was never seen to associate with

mitochondria under any of our conditions. Of note, the cell free mitochondrial import of chimerical proteins in which the presequence of the nuclear encoded human mitochondrial protein COX 8 (subunit 8 of the cytochrome c oxydase) was fused to the N-T of the RFP (precoxVIII-RFP), was impaired by the trypsin pretreatments of the mitochondria (**data not shown**).

Physical interaction between Bax and TOM22, a mitochondrial receptor

We have recently shown that the BH3 only proteins Bid and PUMA interacted with the Hα1 of Bax using a bacterial two hybrid screen [30]. The physical interaction between Bax Hα1 and these BH3 only proteins was confirmed by both structural and functional analyses [30]. During this screening, we found that the mitochondrial protein TOM22 was also capable of interacting with Bax Hα1-RFP but not with RFP or the RFP-Hα9 ΔS184 Bax chimera (**data not shown**). TOM22 has been shown to be involved in protein translocation into mitochondria and has a dual role, as it is a component of the general insertion pore (GIP) together with the pore-forming protein TOM40 and, as such, is involved in protein translocation across the mitochondrial outer membrane [31]. TOM22 is also an import receptor for proteins lacking conventional mitochondrial presequences [32] and contains a large cytosolic domain, which has been shown to be sensitive to proteolysis [33, 34].

All these data were consistent with a putative role for TOM22 as a mitochondrial receptor of Bax. To strengthen this contention, we used several strategies including cell free assays and *in vitro* analyses in resting or apoptotic cells. Firstly, we used a linear peptide scan derived from epitope mapping [35] in which the whole sequence of Bax was decomposed into 12mer peptides overlapping by 10 residues covalently bound to a nitrocellulose membrane. The membranes were incubated with mitochondrial extracts and the presence of proteins bound to the Bax peptides was analyzed by immunoblots (see experimental procedures). As shown in **Fig. 2A**, several domains of Bax were strongly labeled with anti-TOM22 antibodies: the central region of the Hα1 sequence

(namely KTGALLLQ) and the short loop between the central helices Hα5 and Hα6 (namely LCTKVPEL). Of note, these two sequences have been shown to be implicated in the addressing and the insertion of Bax into mitochondrial membrane [9, 10]. Interestingly, a weaker interaction was observed with the hydrophobic Hα9 and the 2 regions flanking the BH3 domain of Bax (**Fig. 2A**). The interaction of VDAC with Bax has been suggested [36] but only a faint association of Bax peptides with VDAC was observed under our conditions (**Fig. 2A**), suggesting that the Bax/VDAC association does not occur through "linear" primary sequences.

Secondly, cross-linking experiments were performed to categorize the Bax/TOM22 interaction (**Fig. 2B,C**). We used conditions (i.e. incubation time, concentrations of proteins…) under which tBid activated Bax formed ordered oligomers in a cell free assay. We find, by immunoprecipitation of the cross linked products, that TOM22 was present only in the 38 kDa complex and absent in the 65 and the 85 kDa complexes (**Fig. 2B**). The latter results confirmed the interaction of Bax with TOM22 but also showed that it was transient and detectable only in the first step of its oligomerization. We also used a similar strategy with Bax ψ, Hα1-RFP and RFP-Hα9 ΔS184 but with 2 different cross-linkers (either EGS or DSS). As shown in **Fig. 2C**, in the presence of either cross-linker, the molecular weight of Hα1-RFP associated with mitochondria shifted from 30 to 46 kDa and that of Bax ψ from 19 to 35 kDa. In contrast, no change in the apparent molecular weight of RFP-Hα9 ΔS184 was observed under the same conditions in the presence of mitochondria (**Fig. 2C**) or higher amounts of proteins (**data not shown**). Since the change in the apparent molecular weights was consistent with an association of these proteins with TOM22, we immunoprecipitated the cross-linked products with antibodies directed against human TOM22 or TOM 20, another receptor of the outer membrane translocase. As shown in **Fig. 2C**, Hα1-RFP and Bax ψ cross-linked products were immunoprecipitated with anti-TOM22 antibodies but not with anti-TOM20 antibodies.

Thirdly, to confirm the physical association between Bax α and TOM22 under more physiological context, we immunoprecipitated TOM22 and Bax α from cellular extracts obtained from resting or STS-treated (i.e. apoptotic) GBM Bax (+) cells [5]. Western blots analysis of proteins co-immunoprecipitated with TOM22 or Bax α showed that in resting cells TOM22 was associated with TOM40 and that it became associated with Bax α under apoptotic conditions (**fig. 2D**). On the other hand, Bcl-2 was co-immunoprecipitated with Bax in resting cells and in apoptotic cells (**fig. 2D**).

Involvement of TOM22 in the association of Bax with mitochondria and in subsequent apoptosis

Import of precursor proteins into isolated mitochondria can be inhibited by antisera raised against components of the translocation machinery of the outer membrane [37, 38]. We saturated rat liver mitochondria either with anti-TOM22 or with antibodies raised against several other outer membrane proteins (i.e. TOM20, and metaxin 1 , PBR and VDAC 1) and analyze the association of Bax α under these different conditions. As shown in **Fig. 3A, B**, the preincubation of mitochondria with anti-TOM22 antibodies specifically inhibited activated Bax α binding to mitochondria whereas other antibodies had no effect. Similar results were obtained with Bax ψ whilst the association of BaxΔS184 to the organelle was affected by neither antibodies (**Fig. 3B**). As a positive control for protein import into mitochondria, we used preCOX VIII-RFP construct and antibodies raised against mitochondrial import receptors (i.e. TOM20, TOM22, Metaxin 1) inhibited its association with mitochondria (**Fig. 3B**).

To address the question of the involvement of TOM22 in an *in vitro* model of induction of apoptosis, we microinjected antibodies raised against TOM22 into rat glioma A15A5 cell line which express Bax α [39], and then induced apoptosis with staurosporine (STS). The STS-induced apoptosis was inhibited by anti-TOM22 antibodies in a dose-dependent manner (**Fig. S1**). On the other hand, microinjection of antibodies directed against other mitochondrial receptors (e.g. TOM20, metaxin 1, or PBR) did not affect STS-induced apoptosis (**Fig. 3C**).

Next we used human *glioblastoma multiforme* (GBM) cells deficient in Bax [Bax (-) GBM] or expressing Bax α [Bax (+) GBM] [5]. These cells were microinjected with either control IgG or anti-TOM22 antibodies. Microinjection of anti-TOM22 antibodies inhibited STS-induced apoptosis in Bax (+) GBM cells, while no differences in the low percentage of cell death were detected between Bax (-) GBM cells injected with anti-TOM22 and control antibodies (**Fig. 3D**).

The decrease of the expression of TOM 22 abolished Bax association with mitochondria in mammals and in yeast

To demonstrate further the functional role of TOM22 in Bax-dependent apoptosis, full-length antisense TOM22 cDNA was stably transfected into Bax (+) GBM cells to generate TOM22 null cells (i.e. TOM22-AS). In yeast, the gene disruption of TOM22 has been reported to affect mitochondrial function [33]. Indeed, mitochondrial protein import in TOM22-AS-treated GBM cells was severely impaired (**Fig. 4A**) and the viability of these cells was reduced unless cultured in the presence of high levels of glucose (**Fig. S2**). We chose cell culture conditions under which TOM22-AS cells were still viable and expressed similar amounts of mitochondrial proteins and other members of the Bcl-2 family comparable to that found in TOM22 expressing cells (**Fig. 4B**). The subcellular localization of Bax in STS-treated or in control TOM22-AS was analyzed by cell fractionation (**Fig. 4C**) and by laser confocal microscopy (**Fig. S3**). Both methods indicated that Bax was efficiently translocated from the cytosol to the mitochondria in cells expressing TOM22 while this translocation was strongly inhibited in TOM22-AS cells (**Fig. 4C; Fig S3**). Of note, no changes in the subcellular localization of Bcl-2, Bcl-Xl and Bak were observed in TOM22-AS cells (**Fig. S3**), suggesting the specificity of the antisense treatment. In agreement with its role as Bax receptor, the lack of TOM22 reduced the amount of cell death caused by STS treatment in TOM22-AS Bax (+) GBM cells to a level similar to that in Bax (-) GBM STS-treated cells (**Fig. 4D**). In contrast, the reduced expression of the mitochondrial import receptor TOM20 by a similar antisense

treatment had little or no influence on STS-induced apoptosis (**Fig. 5**). Of note, in TOM22-AS cells, the association of Bax Ψ but not that of Bax ΔS184 with mitochondria was strongly inhibited (**Fig. 6**), suggesting again that the two mitochondria-bound forms of Bax interacted with different mitochondrial binding sites.

The heterologous expression of human Bax in yeast has been useful to understand molecular aspects of Bax/mitochondria interactions ([40] and references therein). The disruption of the gene *TOM22* is lethal in yeast [33] and thus we used a diploid strain, heterozygote for *TOM22*. The expression of Bax Ψ which is capable of spontaneous association with yeast mitochondria [40], was achieved in *TOM22* +/+ and *TOM22* +/- strains. Western-blots quantification showed that mitochondria isolated from the heterozygote strain contained less TOM22 than mitochondria isolated from the corresponding wild-type (**Fig. 7a**) and it contained less Bax Ψ at the mitochondria (**Fig. 7b**). Bax-T174D, a variant of Bax exhibits a strong binding to mitochondria in yeast (40) and as shown in **Fig. 7 c-d**, the time course of its mitochondrial association was impaired in *TOM22* +/- when compared to that in the wild-type strain. These data are consistent with the hypothesis that Tom22 is also required for Bax-binding to yeast mitochondria.

Discussion

Several models have been proposed to account for the mitochondrial permeability induced by Bax during apoptosis and in all of them the interaction of Bax with the organelle plays an central role [41, 42]. Kuwana *et al.* [21] have observed that Bax could induce a large permeabilization of liposomes in the absence of any proteins. Conversely, other results suggest that the presence of at least one mitochondrial protein was necessary for Bax to mediate outer mitochondrial membrane permeabilization [43]. It has been recently reported that an outer membrane mitochondrial protein, the modulator of apoptosis-1 (MAP-1), is a critical effector of Bax function [44]. Indeed, we show in this work

that the association of Bax with mitochondria requires TOM 22, a mitochondrial outer membrane protein. However, as stated by Newmeyer and Ferguson-Miller [45], the latter observations are not exclusive, since mitochondrial lipids could cooperate with Bax and mitochondrial proteins to form a mitochondrial receptor.

Like most Bcl-2 family members, Bax has a C-T hydrophobic Hα9, which has been hypothesized to be its transmembrane domain. However, unlike Bcl-2 and Bcl-Xl, Bax-Hα9 is not able to drive the mitochondrial binding of RFP [17, 18] and experiments on isolated mitochondria did no support a role for Hα9 in the mitochondrial addressing of Bax [18, 19, 46]. We have recently shown that mutations in Bax Hα1 abolished Bax α binding to mitochondria in a cell-free assay, and inhibited Bax α-induced apoptosis *in vitro* [18]. This result suggested that Hα1 played an essential role in addressing Bax to mitochondria and that the mechanisms of addressing of Bax to mitochondria are consequently distinct from that of Bcl-2 or Bcl-Xl.

In the present study, we have shown that Bax binding to mitochondria requires a protease sensitive partner (**fig. 1**). The two-hybrid approach allowed identifying TOM22 as a potential physical partner of Bax. This physical interaction was further confirmed on isolated mitochondria by cross-linking studies (**Fig. 2**). The interaction Bax/TOM22 was triggered by apoptosis, as shown from co-immunoprecipitation of the two proteins in STS-treated but not in control cells (**Fig.2**). Functionally, both the microinjection of anti-TOM22 antibodies and the knocked-down expression of TOM22 led to the absence of Bax-translocation and the inhibition of Bax-dependent apoptosis (**Fig. 3**). Similarly, decreasing TOM22-expression in human and in yeast cells, led to a significant decrease in Bax-translocation (**Fig. 4,7**). Our previous results suggested that Hα1 was involved in the addressing of Bax to mitochondria but that the the membrane insertion domain of Bax was carried out by Hα5 and Hα6 [10], as previously shown by others [9, 47]. Quite remarkably, TOM 22 can also bind to a region linking the Hα5 and Hα6, suggesting that it might also be involved in the insertion of Bax in the outer mitochondrial membrane (**Fig.**

2). It should be noted that no evidence for an interaction between Bax Hα9 and TOM22 was ever found, supporting our previous reports that Hα9 is not required for any step in the whole process of Bax cytosol-to-mitochondria translocation.

The interaction between TOM22 and Bax is transient, as revealed by kinetics in cross-linking experiments (**Fig.2**), supporting the hypothesis that the association of Bax with TOM complex is a first step towards the formation of another structure, containing Bax-oligomer and possibly other mitochondrial targets [21]. The possible involvement of components of the mitochondrial import machinery in the targeting of Bcl-2 have been suggested by Nguyen *et al* [48] and it has been later reported that Bcl-2 interacts with TOM20, a TOM-complex protein [49, 50]. These results suggest that TOM components could play a major role in the control of the mitochondrial localization of the proteins of the Bcl-2 family. It remains to analyze the molecular mechanisms by which TOM22 (and, possibly, other components of the TOM complex) is involved in the apoptotic outer membrane permeabilization. Finally, since Bax also localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis [51], the mechanism of interaction of Bax with this organelle is still to be determined and in particular its relationship with the organelle import apparatus.

Experimental procedures

Materials

Unless otherwise stated all cell culture material was obtained from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). Monoclonal Bax antibody (clone 4F11) was from Immunotech (Marseille, France) and Monoclonal antibody directed against TOM22 was from Sigma (St Quentin Fallavier, France). Antibodies raised against metaxin 1 and TOM20 were obtained as described respectively in [34, 52, 53]. The mitochondrion-selective probe MitoTracker Green-FM was obtained from Molecular Probes (Interchim, Montlucon, France), and fluorogenic peptide Ac-DEVD-AMC was from Bachem (Voisins, France). Biochemical reagents used in this study were obtained from Sigma.

Methods

Acellular binding of IVT proteins to mitochondria: Mitochondria were isolated from rat liver and the association of radio labeled IVT proteins was performed as previously described [54]. In competition experiments, antibodies (0 to 15 µg) were incubated with mitochondria at 37°C, 10 min prior to the addition of IVT proteins. PhophorImager (Amersham Biosciences) was used to analyze radio labeled proteins present in the mitochondrial pellet after SDS-PAGE separation.

Cell Fractionation: TOM22-AS Bax (+) GBM cells ($2x10^6$) were collected and centrifuged at 800*g* for 10 min at 4 °C, washed with ice-cold PBS and resuspended in CEB (v/v) (250 mM sucrose, 50 mM HEPES, pH 7.4, 50 mM KCl, 2 mM MgCl2, 1 mM dithiothreitol, 10 µM cytochalasin B, 1 mM EGTA, and 1 mM PMSF). Cells were allowed to swell for 30 min on ice. The cells were then homogenized with 30 strokes in a 2-ml glass Dounce homogenizer. The homogenates were centrifuged at 800*g* for 10 min at 4°C, and the resulting supernatants were centrifuged for an additional 15 min at 13,000*g* at 4°C to obtain the mitochondrial pellets (P13). These supernatants were then centrifuged at 100,000*g* for 30 min in an airfuge centrifuge (Beckman), and the resulting cytosolic fraction was further referred to as the S100. The presence of Bax, actin and cytochrome c oxidase (subunit IV) was detected in mitochondrial pellets and S100 using standard Western blot methods.

Confocal Analysis: The cells were incubated for 30 min with 5 µg/ml MitoTracker Green-FM at 37 °C and then fixed with 1:1 methanol/ acetone for 15 min at -20 °C. After saturation with 3% BSA in phosphate-buffered saline, the cells were incubated with antibodies for 1 h at room temperature. After extensive washing, a second anti-mouse or anti-rabbit IgG coupled to rhodamine was added overnight at 4 °C. Images were collected using a Leica TCS NT microscope with a 63 X 1.3 NA Fluotar objective (Leica, Rueil, France).

Induction of apoptosis in vitro: Apoptosis was induced in semi-confluent (50-70%) GBM cultures by the addition of 2 µM STS. Cell death was evaluated 24 h later as it corresponded in all cases to the maximum loss of cell viability. Apoptosis was quantified

by measuring the release of LDH into the culture medium and the cellular DEVDase activity, as previously described [18].

Cross-linking. After incubation of mitochondria (50 µg) with IVT proteins for different times, cross linkers DSS (dissuccinimidyl suberate) or EGS (ethylene glycolbis succinimidylsuccinate) were added in the isotonic Hepes buffer at a final concentration of 5 mM in 1 ml. After a 30 min-incubation at room temperature, the cross-linker was quenched by the addition of 1 M Tris-HCl (pH 7.5). Subsequently, mitochondrial pellets were analyzed in 12% SDS-PAGE gels, followed by PhosphorImager analysis. For immunoprecipitation experiments, mitochondria were solubilized in 100 µl Nonidet P-40 (NP-40) isotonic lysis buffer (142.5 mM KCl, 5 mM MgCl2, 10 mM HEPES [pH 7.2], 1 mM EDTA, 0.25% NP-40, 0.2 mM PMSF, 0.1% aprotinin, 1 µg/ml pepstatin and 1 µg/ml leupeptin), at 4°C for 30 min. Ten micrograms of anti-TOM22, anti-RFP, anti-Bax or anti-TOM20 antibodies were added to each sample, mixed, and incubated on ice for 30 min. Then 400 µl NP-40 buffer and 25 µl protein A-Sepharose gel, were added and incubated at 4°C overnight with gentle agitation. Immunoprecipitates were collected by a 10 min centrifugation at 8,000g, washed three times with 1 ml NP-40 buffer, and were solubilized with SDS before SDS-PAGE and autoradiography analyses.

Microinjection: Microinjection experiments were performed as described in Cartron *et al.* [5]. Briefly, cells were seeded on glass coverslips 24 h prior microinjection using micro-capillaries (femtotips II, Eppendorf) mounted on an automated microinjection system (Eppendorf). Antibodies at the indicated concentrations in PBS together with dextran (70 kDa)-conjugated lysine fixable Oregon green (0.5% final concentration; Molecular Probes) as a co-injection marker were microinjected. Typically, 100 to 150 cells were microinjected using identical pressures (150 hPa) and times (0.1 s).

Peptide scan. Interaction of TOM22 and VDAC with Bax was done using 12mer peptides and a two amino acid frame shift, generating 91 peptides. Peptides were spotted on an Amino-PEG_{500}-UC540 membrane using a MultiPep peptide synthesizer (Intavis AG, Cologne, Germany) at a loading capacity of 400 nmol/cm^2. After synthesis the membrane was dried then the capped side-chains were deprotected by cleavage for 2 hours with a

cocktail containing 95% TFA, 3% tri-isopropyl, 2% H_2O. TFA was removed and the membrane rinsed with dichloromethane, followed by ethanol and then H_2O. The membrane was dried before use. Mitochondria were lysed in 50 mM NaCl, 5 mM 6-hexanoic acid, 50 mM imidazole, CHAPS 1%, pH 7.0 on ice for 30 min, then centrifuged 10 min at 16000g. Membranes were saturated with 5% BSA-PBS, and then incubated with 2 mg/ml mitochondrial extract. After which, it was washed three times with 1% BSA-PBS then positive spots were revealed as primary antibodies polyclonal anti TOM22 and VDAC antibodies and secondary antibodies were revealed by the BM chemiluminescence kit (Roche Diagnostics). The binding intensities of TOM22 or VDAC for Bax-derived peptides were determined by quantification using IP-Lab Gel software (Signal Analytics) and converted to sequence-specific normalized units. The intensities obtained for each peptide covering a given amino-acid were added and divided by the number of peptides.

Transfection of full length antisense TOM22and TOM 20. To inhibit the expression of TOM22 or TOM 20 in Bax (+) and Bax (-) GBM cells, cells were transfected with two consecutive electroporations with 10 µg plasmid encoding for the anti-full length sequence of human TOM22 or TOM 20. The bulk of cells were selected for 20 days with 250 µg/ml G418 and frozen to avoid clonal bias. TOM22-AS cells were cultured for no longer than 5 days in high glucose medium (3%) before analysis in order to avoid viability loss due to the lack of expression of TOM22.

Trypsin treatment of mitochondria: Mitochondria (1 mg) were treated with 5 or 50 µg trypsin for 30 min at 0°C in 1 ml isotonic buffer (210 mM mannitol; 70 mM sucrose; 5 mM Hepes, pH 7.5; 1 mM EDTA). At the end of the incubation, 5 µg bovine trypsin pancreatic inhibitor and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) was added. Control mitochondria were treated similarly using 50 µg bovine serum albumin (BSA) as a mock treatment followed by incubation with 5 µg bovine trypsin pancreatic inhibitor and 1 mM PMSF. IVT proteins were then added to treated or mock-treated mitochondria and their binding to the organelle was analyzed as described above.

Yeast experiments: The *TOM22*:kanMX4 cassette was amplified by PCR from the genomic DNA of the strain Y22945 (Euroscarf collection). The PCR fragment was used to transform the W303D diploid strain (mat a/α, *ade2/ade2, his3/his3, leu2/leu2, trp1/trp1, ura3/ura3*) and selected for the resistance to geneticin (400 µg/mL). Since the complete absence of TOM22 is lethal, only the heterozygote could survive. The presence of the disruption cassette was verified by PCR with one primer located in the promoter of TOM22 and one located inside the gene kanMX4. W303D and W303D-Δ*tom22* were transformed with plasmids pYES3-BaxΨ and pYES3-Bax-T_{174}D [40] and selected for growth in the absence of uracile and tryptophan, respectively. These plasmids expressed these active variants of Bax under the control of the regulatable promoter *GAL1/10*. Cells were grown aerobically in a lactate-supplemented SD medium and Bax-expression was induced by the addition of 1% galactose. Cells were harvested, mitochondria were isolated and quantifications of the different mitochondrial proteins was done by western-blot analysis [40].

Acknowledgments: We thank Dr N. Vita (Sanofi Recherche) for the gift of the anti-PBR antibodies and Dr Carla Koehler (UCLA) for the polyclonal serum against yeast Tom22p. This work was supported by grants from INSERM, Université de Nantes and " Ligue Nationale contre le Cancer" ("Programme Equipe Labellisée Ligue").

References

1. Adams JM, Cory S: Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family, Trends Biochem Sci 2001, 26:61-66
2. Adams JM: Ways of dying: multiple pathways to apoptosis, Genes Dev. 2003, 17:2481-2495
3. Cory S, Adams JM: The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch, Nat Rev Cancer 2002, 2:647-656
4. Danial NN, Korsmeyer SJ: Cell death: critical control points, Cell 2004, 116:205-219
5. Cartron PF, Juin P, Oliver L, Martin S, Meflah K, Vallette FM: Nonredundant role of Bax and Bak in bid-mediated apoptosis, Mol Cell Biol 2003, 23:4701-4712
6. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ: Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death, Science 2001, 292:727-730
7. Zong W-X, Lindsten T, Ross AJ, MacGregor GR, Thompson CB: BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak, Genes Dev. 2001, 15:1481-1486

8. Suzuki M, Youle RJ, Tjandra N: Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization, Cell 2000, 103:645-654
9. Heimlich G, McKinnon AD, Bernardo K, Brdiczka D, Reed JC, Kain R, Kronke M, Jurgensmeier JM: Bax-induced cytochrome c release from mitochondria depends on alpha-helices-5 and -6, Biochem J 2004, 378:247-255
10. Cartron P-F, Arokium H, Oliver L, Meflah K, Manon S, Vallette FM: Distinct Domains Control the Addressing and the Insertion of Bax into Mitochondria, J. Biol. Chem. 2005, 280:10587-10598
11. Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ: Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis, Proc Natl Acad Sci U S A 1997, 94:3668-3672
12. Schinzel A, Kaufmann T, Borner C: Bcl-2 family members: intracellular targeting, membrane-insertion, and changes in subcellular localization, Biochim Biophys Acta 2004, 1644:95-105
13. Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B, Martinou JC: Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells, J Biol Chem 2001, 276:11615-11623
14. Bouchier-Hayes L, Lartigue, Lydia, Newmeyer, Donald D.: Mitochondria: pharmacological manipulation of cell death
J. Clin. Invest. 2005, 115:2640-2647
15. Nguyen M, Branton PE, Walton PA, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ, Shore GC: Role of membrane anchor domain of Bcl-2 in suppression of apoptosis caused by E1B-defective adenovirus, J Biol Chem 1994, 269:16521-16524
16. Kaufmann T, Schlipf S, Sanz J, Neubert K, Stein R, Borner C: Characterization of the signal that directs Bcl-xL, but not Bcl-2, to the mitochondrial outer membrane, J. Cell Biol. 2003, 160:53-64
17. Nechushtan A, Smith CL, Hsu YT, Youle RJ: Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death, Embo J 1999, 18:2330-2341
18. Cartron P-F, Priault M, Oliver L, Meflah K, Manon S, Vallette FM: The N-terminal End of Bax Contains a Mitochondrial-targeting Signal, J. Biol. Chem. 2003, 278:11633-11641
19. Tremblais K, Oliver L, Juin P, Le Cabellec TM, Meflah K, Vallette FM: The C-terminus of bax is not a membrane addressing/anchoring signal, Biochem Biophys Res Commun 1999, 260:582-591
20. Linseman DA, Butts BD, Precht TA, Phelps RA, Le SS, Laessig TA, Bouchard RJ, Florez-McClure ML, Heidenreich KA: Glycogen Synthase Kinase-3 Phosphorylates Bax and Promotes Its Mitochondrial Localization during Neuronal Apoptosis, J. Neurosci. 2004, 24:9993-10002
21. Kuwana T MM, Perkins G, Ellisman MH, Latterich M, Schneiter R, Green DR, Newmeyer DD. : Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane., Cell 2002, 111:331-342.
22. Jürgensmeier J, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed J: Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria
PNAS 1998, 95:4997-5002.
23. von Ahsen O, Renken C, Perkins G, Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Newmeyer DD: Preservation of Mitochondrial Structure and Function after Bid- or Bax-mediated Cytochrome c Release, J. Cell Biol. 2000, 150:1027-1036
24. Roucou X, Montessuit S, Antonsson B, Martinou JC: Bax oligomerization in mitochondrial membranes requires tBid (caspase-8-cleaved Bid) and a mitochondrial protein, Biochem J 2002, 368:915-921
25. Schinzel A, Kaufmann T, Schuler M, Martinalbo J, Grubb D, Borner C: Conformational control of Bax localization and apoptotic activity by Pro168, J Cell Biol 2004, 164:1021-1032
26. Argan C, Lusty J, Shore G: Membrane and cytosolic components affecting transport of the precursor for ornithine carbamyltransferase into mitochondria, J. Biol. Chem. 1983, 258:6667-6670.

27. Pfanner N, Muller H, Harmey M, Neupert W: Mitochondrial protein import: involvement of the mature part of a cleavable precursor protein in the binding to receptor sites., EMBO J. 1987, 6 3449-3454.
28. Cartron PF, Oliver L, Martin S, Moreau C, LeCabellec MT, Jezequel P, Meflah K, Vallette FM: The expression of a new variant of the pro-apoptotic molecule Bax, Baxpsi, is correlated with an increased survival of glioblastoma multiforme patients, Hum Mol Genet 2002, 11:675-687
29. Cartron PF, Oliver L, Juin P, Meflah K, Vallette FM: The p18 truncated form of Bax behaves like a Bcl-2 homology domain 3-only protein, J Biol Chem 2004, 279:11503-11512
30. Cartron PF, Gallenne T, Bougras G, Gautier F, Manero F, Vusio P, Khaled M, Vallette FM, Juin P: The first helix of Bax plays a necessary role in its ligand-induced activation by the BH3-only proteins BID and PUMA, Mol Cell 2004, 16:807-818
31. Ahting U, Thieffry M, Engelhardt H, Hegerl R, Neupert W, Nussberger S: Tom40, the Pore-forming Component of the Protein-conducting TOM Channel in the Outer Membrane of Mitochondria, J. Cell Biol. 2001, 153:1151-1160
32. Truscott KN, Brandner K, Pfanner N: Mechanisms of Protein Import into Mitochondria, Current Biology 2003, 13:R326-R337
33. Van Wilpe S RMT, Hill K, Maarse AC., Meisinger C, Brix J, Dekker P.J.T., Mockzo M, Wagner R, Meijer M, Guiard B, Hölinger A, Pfanner N: Tom22 is a multifunctional organizer of the mitochondrial preprotein translocase, Nature 1999, 401:485-489
34. Saeki K, Suzuki H, Tsuneoka M, Maeda M, Iwamoto R, Hasuwa H, Shida S, Takahashi T, Sakaguchi M, Endo T, Miura Y, Mekada E, Mihara K: Identification of Mammalian TOM22 as a Subunit of the Preprotein Translocase of the Mitochondrial Outer Membrane, J. Biol. Chem. 2000, 275:31996-32002
35. Brix J, Rudiger S, Bukau B, Schneider-Mergener J, Pfanner N: Distribution of Binding Sequences for the Mitochondrial Import Receptors Tom20, Tom22, and Tom70 in a Presequence-carrying Preprotein and a Non-cleavable Preprotein, J. Biol. Chem. 1999, 274:16522-16530
36. Narita M, Shimizu S, Ito T, Chittenden T, Lutz R, Matsuda H, Tsujimoto Y: Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria, J. Biol. Chem. 1998, 95:14681-14686
37. Ohba M, Schatz M: Protein import into yeast mitochondria is inhibited by antibodies raised against 45-kd proteins of the outer membrane., EMBO J. 1987, 6:2109–2115.
38. Sollner T, Griffiths G, Pfaller R, Pfanner N, W. N: MOM19, an import receptor for mitochondrial precursor proteins, Cell 1989 59:1061-1070
39. Oliver L, Priault M, Tremblais K, LeCabellec M, Meflah K, Manon S, Vallette FM: The substitution of the C-terminus of bax by that of bcl-xL does not affect its subcellular localization but abrogates its pro-apoptotic properties, FEBS Lett 2000, 487:161-165
40. Arokium H, Camougrand N, Vallette FM, Manon S: Studies of the interaction of substituted mutants of Bax with yeast mitochondria reveal that the C-terminal hydrophobic a-helix is a second ART sequence, and plays a role in the interaction with anti-apoptotic Bcl-xL, J Biol Chem 2004,
41. Martinou J, Green D: Breaking the mitochondrial barrier, Nature Reviews Molecular Cell Biology 2001, 2:63-67
42. Zamzami N, Kroemer G: THE MITOCHONDRION IN APOPTOSIS: HOW PANDORA'S BOX OPENS, Nature Reviews Molecular Cell Biology 2001, 2:67-71
43. Roucou X, Rostovtseva T, Montessuit S, Martinou JC, Antonsson B: Bid induces cytochrome c-impermeable Bax channels in liposomes, Biochem J 2002, 363:547-552
44. Tan K, Fu N, Sukumaran S, Chan S, Kang J, Poon B, Chen B, Yu V: MAP-1 is a mitochondrial effector of Bax, Proc. Natl Acad. Sci. (USA) 2005, 102:14623-14628
45. Newmeyer DD, Ferguson-Miller S: Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death, Cell 2003, 112:481-490
46. Priault M, Cartron PF, Camougrand N, Antonsson B, Vallette FM, Manon S: Investigation of the role of the C-terminus of Bax and of tc-Bid on Bax interaction with yeast mitochondria, Cell Death Differ 2003, 10:1068-1077

47. Nouraini S, Six E, Matsuyama S, Krajewski S, Reed JC: The putative pore-forming domain of Bax regulates mitochondrial localization and interaction with Bcl-X(L), Mol Cell Biol 2000, 20:1604-1615
48. Nguyen M, Millar D, Yong V, Korsmeyer S, GC S: Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH- terminal signal anchor sequence, J. Biol. Chem. 1993, 268:25265-25268.
49. Motz C, Martin H, Krimmer T, Rassow J: Bcl-2 and Porin Follow Different Pathways of TOM-dependent Insertion into the Mitochondrial Outer Membrane, Journal of Molecular Biology 2002, 323:729-738
50. Schleiff E, Shore G, Goping I: Human mitochondrial import receptor, Tom20p. Use of glutathione to reveal specific interactions between Tom20-glutathione S-transferase and mitochondrial precursor proteins, FEBS Letters 1997, 404:314-318.
51. Zong W-X, Li C, Hatzivassiliou G, Lindsten T, Yu Q-C, Yuan J, Thompson CB: Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis, J. Cell Biol. 2003, 162:59-69
52. Armstrong LC, Komiya T, Bergman BE, Mihara K, Bornstein P: Metaxin Is a Component of a Preprotein Import Complex in the Outer Membrane of the Mammalian Mitochondrion, J. Biol. Chem. 1997, 272:6510-6518
53. Armstrong LC SA, Bornstein P.: Metaxin 1 interacts with metaxin 2, a novel related protein associated with the mammalian mitochondrial outer membrane., J.Cell. Biochem. 1999, 74:11-22
54. Vallette F, Juin P, Pelleschi M, Henry J: Basic peptides can be imported into yeast mitochondria by two distinct targeting pathways. Involvement of the peptide-sensitive channel of the outer membrane, J. Biol. Chem. 1994, 269:13367-13374

Figure legends

Figure 1: Bax interacts with a proteinaceous receptor. A) Mild trypsin treatment of mitochondria. Purified rat liver mitochondria (50 µg protein) were treated with increasing concentrations of trypsin for 30 min at 4°C before immunoblot analysis of selected mitochondrial protein. This immunoblot is representative of at least 5 independent experiments. **B)** Association of Bax construct with trypsin-treated mitochondria. IVT radio labeled Bax constructs were added to mitochondria, control (0) or treated with 5 or 50 µg/ml trypsin; I25% : 25% of the original input of IVT proteins. This immunoblot illustrates the results of at least 5 independent experiments.

Figure 2: Bax interacts with TOM22. A) Binding of hTom22 to a peptide scan consisting of 12-mers derived from Bax**.** Mitochondrial extracts were incubated with the peptides containing membrane as indicated in the experimental procedures. The Interaction of Tom22 with peptides were revealed by immunoblotting analysis using anti-human Tom22 antibody (clone 1C9-2, Sigma) (upper panel). As a negative control the binding of VDAC to the membrane was revealed by immunoblotting analysis using anti-human VDAC antibody (anti-porin 31HL, Calbiochem). The binding intensities of Tom22 or VDAC for Bax-derived peptides were determined by quantification using IPLab Gel software (Signal Analytics) and converted to sequence-specific normalized units in the graph. The intensities obtained for each peptide covering a given amino-acid were added and divided by the number of peptides (TOM22: □-□; VDAC : -----). **B)** 5 fmol. IVT activated Bax were incubated with 1 mg mitochondria at room temperature at the indicated times (cont: Bax without mitochondria) before the addition of DSS and washing. After resuspension, the mitochondrial pellets were subjected to immunoprecipitation with either anti Bax or anti TOM 22 antibodies as described in experimental procedures. This autoradiography is representative of three independent experiments **C)** Cross-linking experiments were performed after the incubation of IVT ^{35}S-labeled Bax constructs wit h1 mg mitochondria as described in B for 30 minutes.

Mitochondrial pellets were subjected to immunoprecipitation (IP) with 4µg of antibodies directed against RFP, Bax, TOM22 or TOM20. This autoradiography is representative of three independent experiments. **D)** Interaction of Bax and TOM22 in untreated or STS-treated Bax (+) GBM cells. Cells were treated with STS as described in Methods section. Cells were sonicated and the resulting lysates were subjected to immunoprecipitation with either anti-TOM22 or anti-Bax antibodies. The specificity of the immunoprecipitation with anti-TOM22 antibodies was assessed by the presence of TOM40 in the immunoprecipitated complex and that of anti-Bax by the presence of Bcl-2. Note that in untreated cells, large amounts of Bcl-2 were immunoprecipitated with Bax, and that the induction of apoptosis decreased this association. Data illustrated are representative of 3 different experiments.

Figure 3: Antibodies directed against TOM22 specifically inhibit the binding of Bax to mitochondria. A) Competition between increasing concentrations of antibodies (from 0 to 15 µg) directed against a panel of mitochondrial outer membrane proteins and the binding of IVT activated Bax α. Gel representative of 3 different experiments. **B)** Quantification of the binding of Bax α, Bax ψ, Bax ΔS184 Bax and preCOX VIII-RFP, performed from 3 different experiments as that illustrated in A, using IPLab Gel software (Signal Analytics). **C)** Rat glioma A15A5 cells, were microinjected with 15 µg antibodies raised against selected receptors of the outer membrane of mitochondria viz. PBR, Metaxin 1 (Mtx), TOM20, TOM22 and control IgGs prior to induction of apoptosis by STS. Cell death was measured every 45 min. as described in experimental procedures. **D)** Inhibiting concentrations of anti-TOM22 (15 µg) (■) were microinjected into 100 to 150 human GBM cells expressing Bax or not [Bax (+) and Bax (-) GBM] prior to the induction of apoptosis by 2 µM STS. Non-immune IgG (□) was used as a control. Cell death was followed and quantified described in experimental procedures, until almost all Bax (+)GBM cells were dead.

Figure 4: Effect of the transfection of full-length antisense TOM22 cDNA in Bax (+) GBM cells. A) Confocal analysis of TOM22 expression and preCOX VIII-RFP subcellular localization in human GBM cells treated with antisense TOM22 or not on day 5. **B)** The expression of key mitochondrial proteins and members of the Bcl-2 family was analyzed by Western blots in GBM cells, treated with TOM22 antisense (-) and compared to that observed in untreated cells (+). Both cells were grown in 3% glucose culture medium. Data illustrated are representative of 3 different experiments. **C)** Subcellular fractionation and immunoblot analyses of Bax in STS-treated (Apop) and untreated (Rest) TOM22- and TOM22+ cells. Staining with antibodies raised against cytochrome c oxidase (subunit IV; Cox) and actin were used, respectively, as controls for mitochondrial and cytosolic fractions. Data illustrated are representative of 3 different experiments. **D)** The response of TOM22- cells to STS-induced apoptosis was compared to that of TOM22+ cells expressing or not Bax. Apoptosis was quantified by measuring cellular caspase activity (i.e. DEVDase) and the percentage of trypan blue-positive cells. Data illustrated are representative of 3 different experiments.

Figure 5: TOM20 AS treatment did not affect STS-induced apoptosis. A) The expression of TOM20 was analyzed by immunoblots in GBM cells treated with TOM22 or TOM20 antisense and compared to that in untreated cells. Data illustrated are representative of 3 different experiments. **B**) The response to STS-induced apoptosis was compared between TOM20- and TOM20+ cells. Apoptosis was quantified by measuring cellular caspase activity (i.e. DEVDase). Data (mean and SD) were calculated from 3 different experiments.

Figure 6: TOM22-AS treatment does not affect Bax ΔS184 translocation to mitochondria but decreases its amplification of STS-induced apoptosis.

A) Confocal analysis of the subcellular localization of ectopically added Bax Ψ and Bax ΔS184 in Bax (-) GBM TOM22-AS (TOM22-) and Bax (-) GBM (TOM22+) cells. Overlay of Bax (-) GBM cells transfected with Bax α and Bax ΔS184 immunostained with Bax

antibodies and MitoTracker green. Correlation factor (CF), calculated from Metamorph analyses as described in 18 , indicated that no significant changes in the subcellular localization and in the amount of expression was observed for Bax ΔS184 in TOM22 (+) or in the TOM22 (-) cells. On the other hand, Bax Ψ, which was essentially mitochondrial in TOM22 (+) cells becomes cytosolic in TOM22- cells.

Figure 7: The knock down of the expression of TOM22 in yeast decrease Bax binding to mitochondria: A) Wild-type diploid W303D (*TOM22* +/+) or the heterozygote diploid W303D-Δ*tom22* (*TOM22* +/-) strains express different amount of the protein TOM22 (TOM22p). VDAC was used an internal control. **B-C)** The two strains transformed with pYES plasmids encoding for Bax Ψ (**B**) or Bax-T_{174}D (**C**). Bax-expression was achieved for 14 hours for Bax α (**B**) and at the indicated times for Bax-T_{174}D (**C**). Mitochondria were isolated and proteins were probed with a monoclonal antibody against yeast VDAC (Molecular Probes), polyclonal sera against Bax or yeast Tom22p. Non-saturated Western Blots were scanned and quantified with ImageJ software. **D)** Calculation of the amount of Bax (relative to VDAC) bound to mitochondria in the two strains. The average ratio of mitochondrial BaxT_{174}D relative to VDAC was calculated for each point and expressed relatively to the ratio TOM22/VDAC present in the wild-type strain which was arbitrarily fixed at 1.

Supplementary data

Figure S1: 100 to 150 rat glioma cells, A15A5, were microinjected with 15 µg of non immune IgG or increasing concentrations (0 to 15 µg) of antibodies raised against TOM22 and treated with 2 µM staurosporine (STS). Cell death was assayed as described in Cartron et al. (2003) *Mol Cell Biol* 23, 4701-12.

Figure S2: Cell viability of GBM and GBM TOM 22 antisense treated in the presence or in the absence of high glucose in the culture medium. Cell death was monitored using blue trypan coloration as described in Cartron et al. (2003) *Mol Cell Biol* 23, 4701-12. Data illustrated are representative of 3 different experiments.

Figure S3: Subcellular localization of Bax, Bcl-Xl, Bcl-2 and Bak in STS-treated or in untreated TOM22- and TOM22+ cells. Confocal analysis of the intracellular localization of Bcl-Xl (A), Bcl-2 (B) and Bak (C) in TOM22+ or TOM22- cells. Pictures show Bcl-Xl, Bcl-2 or Bak staining in red and the mitochondrial marker (MitoTracker) in green, as well as the overlay. Correlation factors (CF) were calculated as described in Cartron et al. (2003) *Mol Cell Biol* 23, 4701-12.

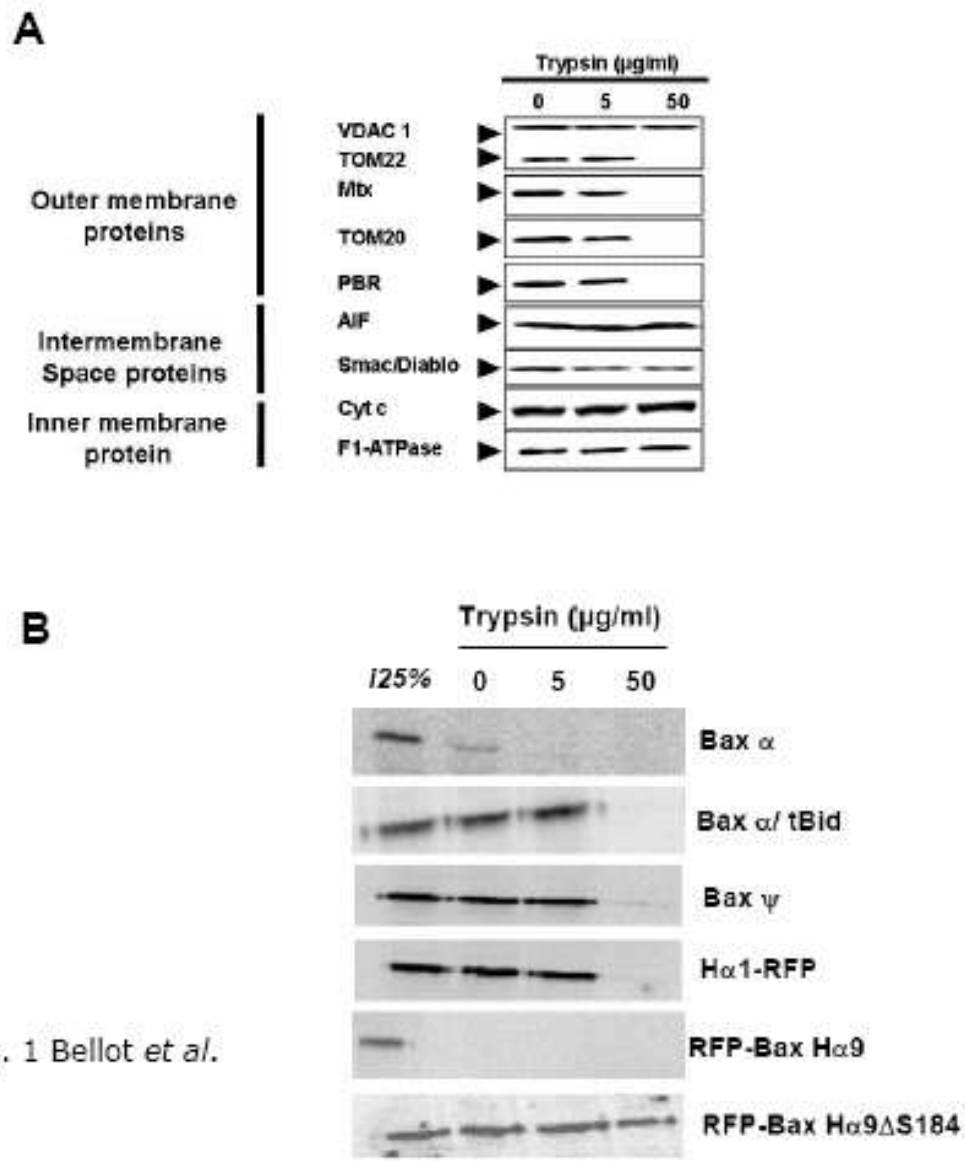
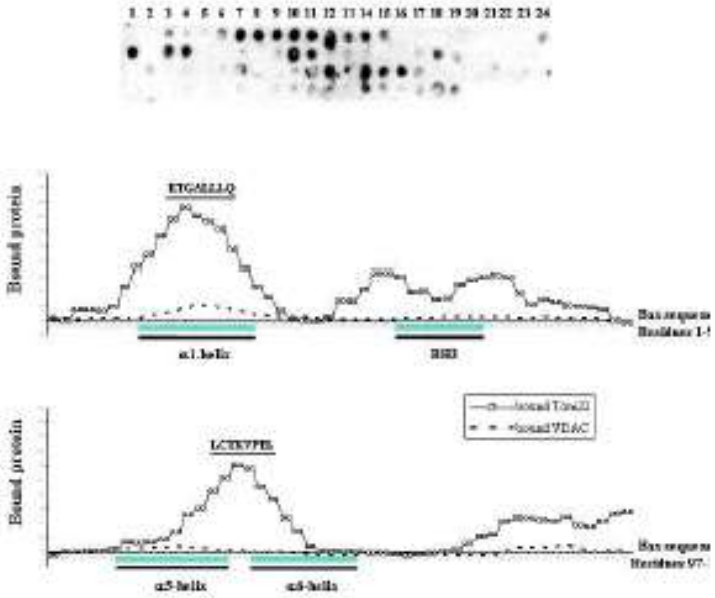


Fig. 1 Bellot *et al.*

A



B

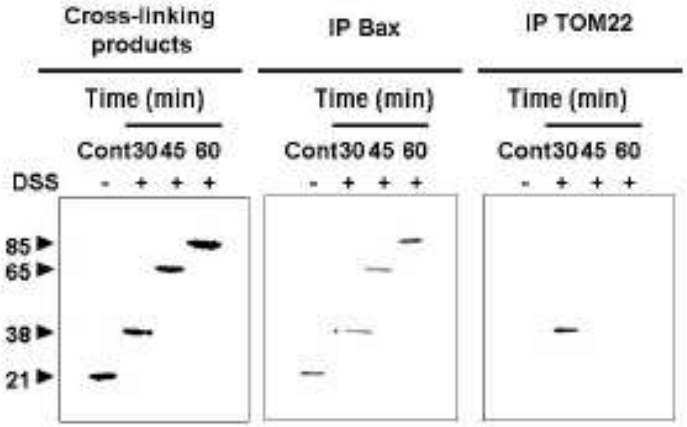


Fig. 2 A,B Bellot *et al.*

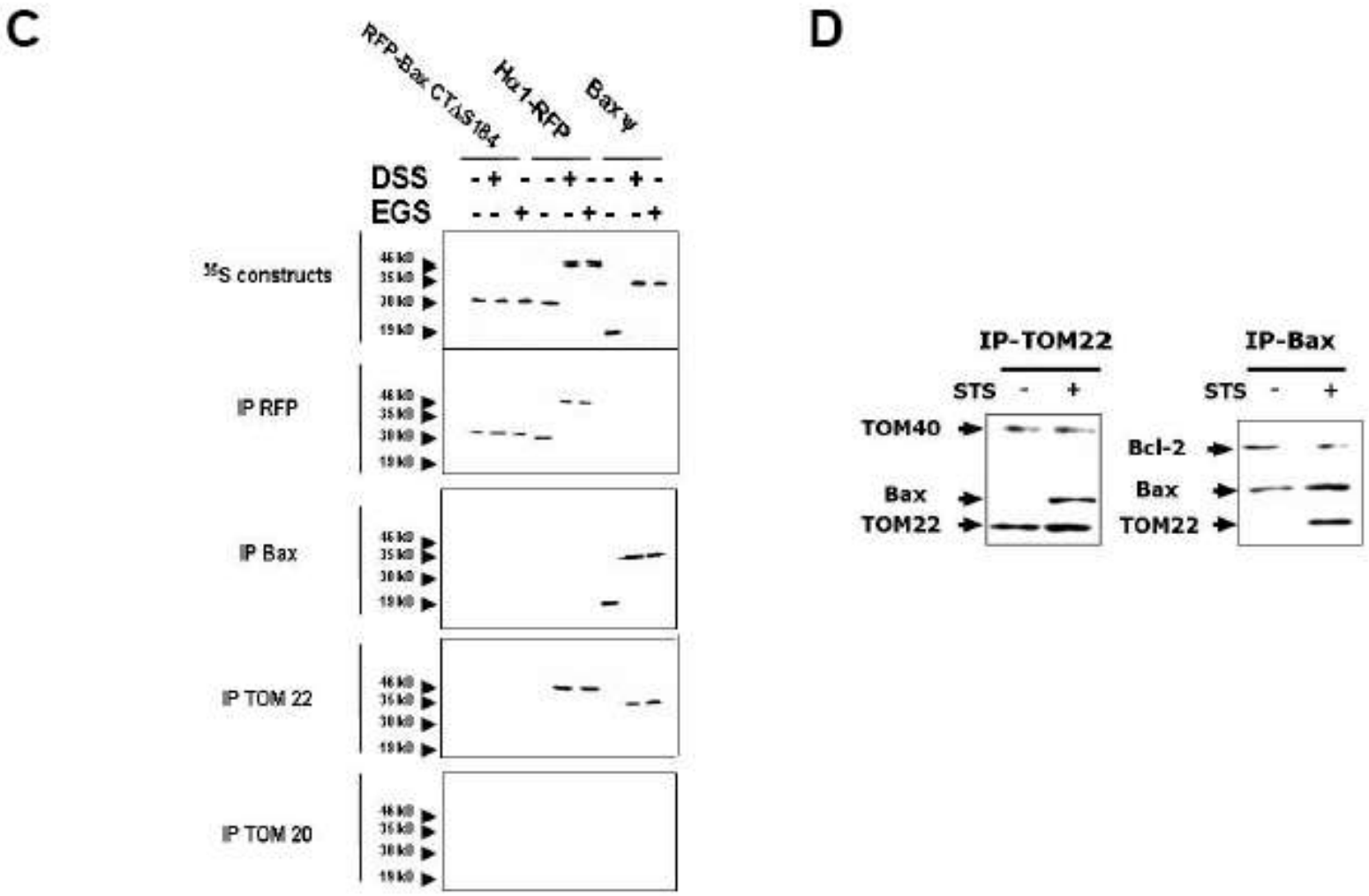


Fig. 2 C,D Bellot *et al.*

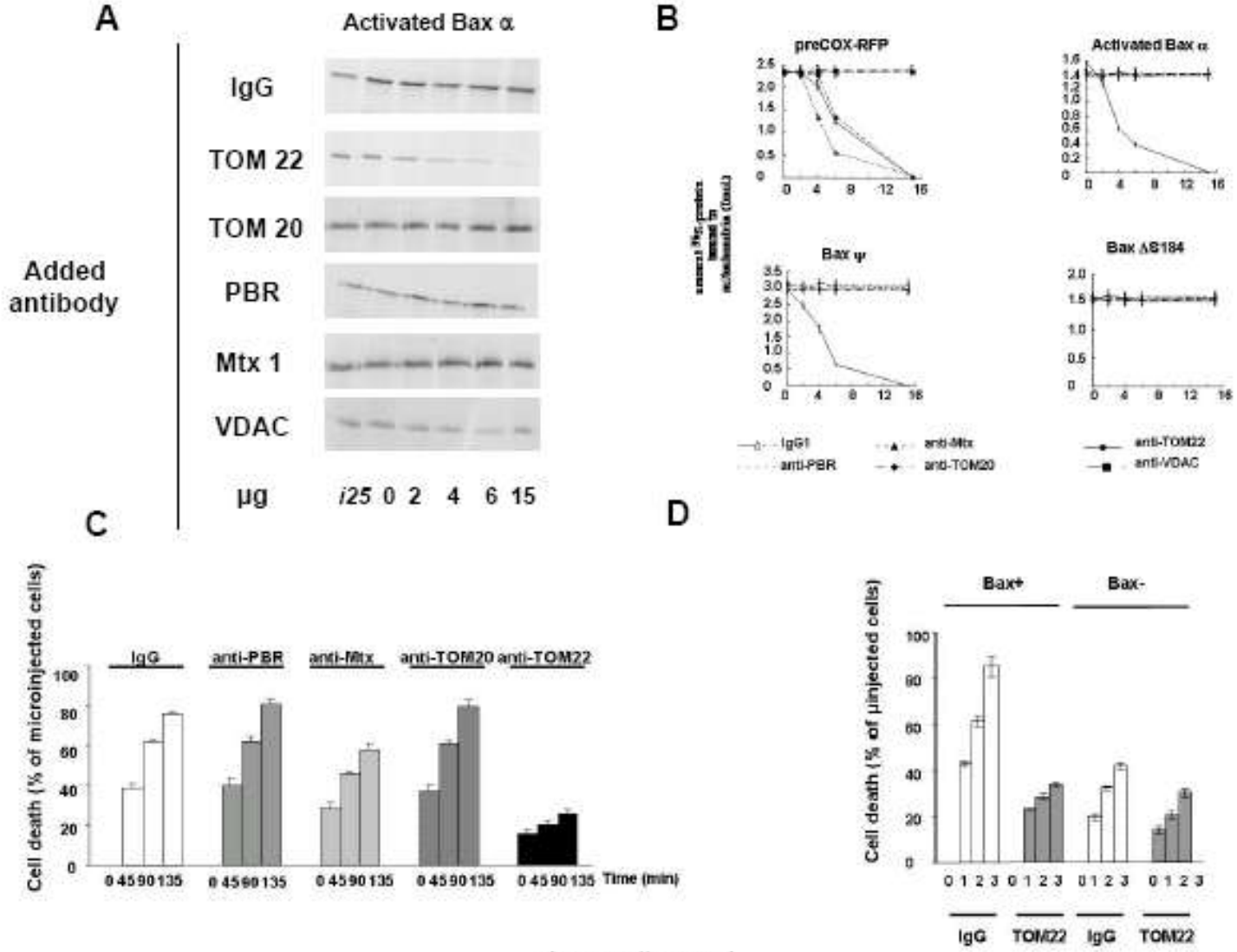


Fig. 3 Bellot *et al*

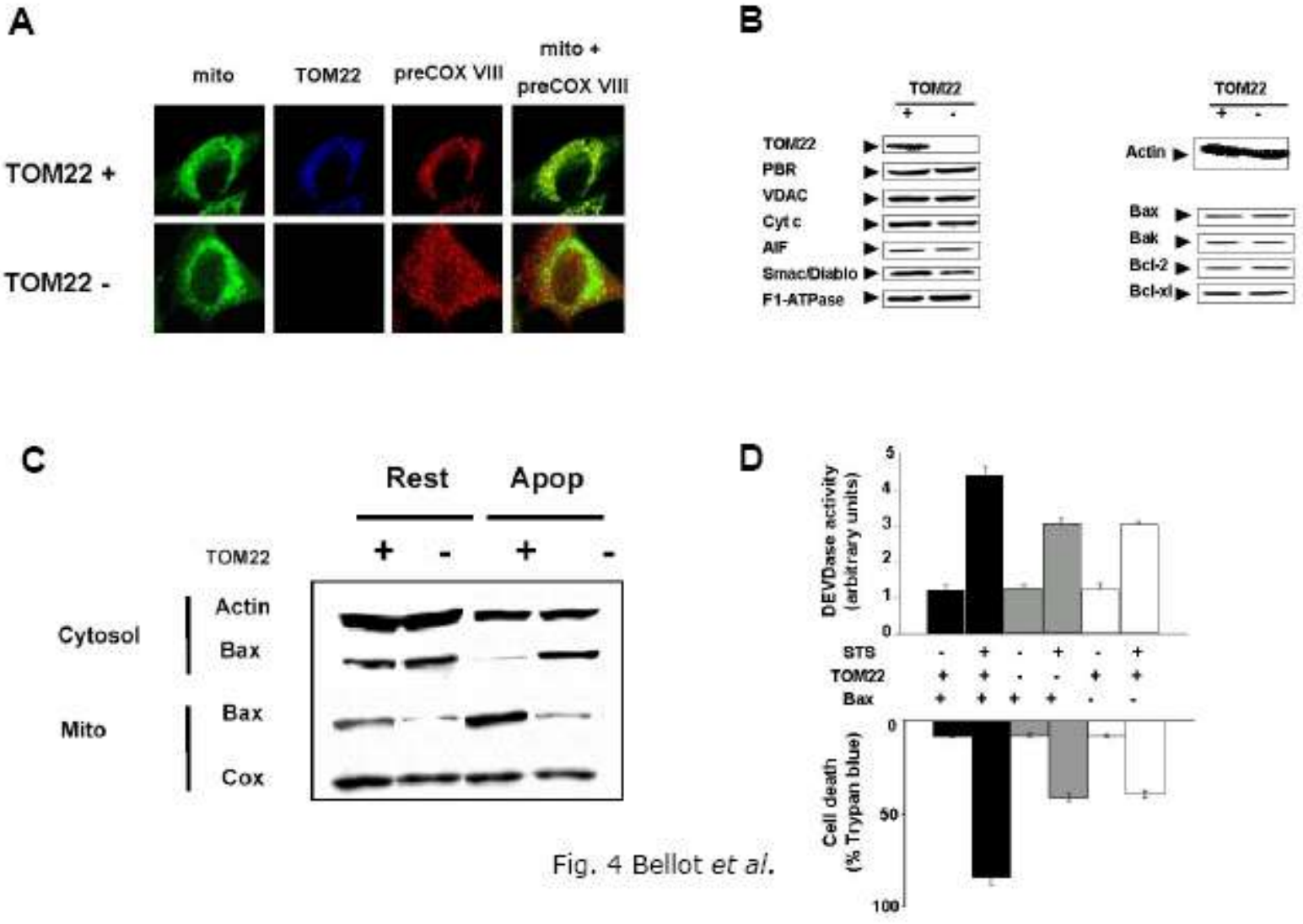


Fig. 4 Bellot *et al.*

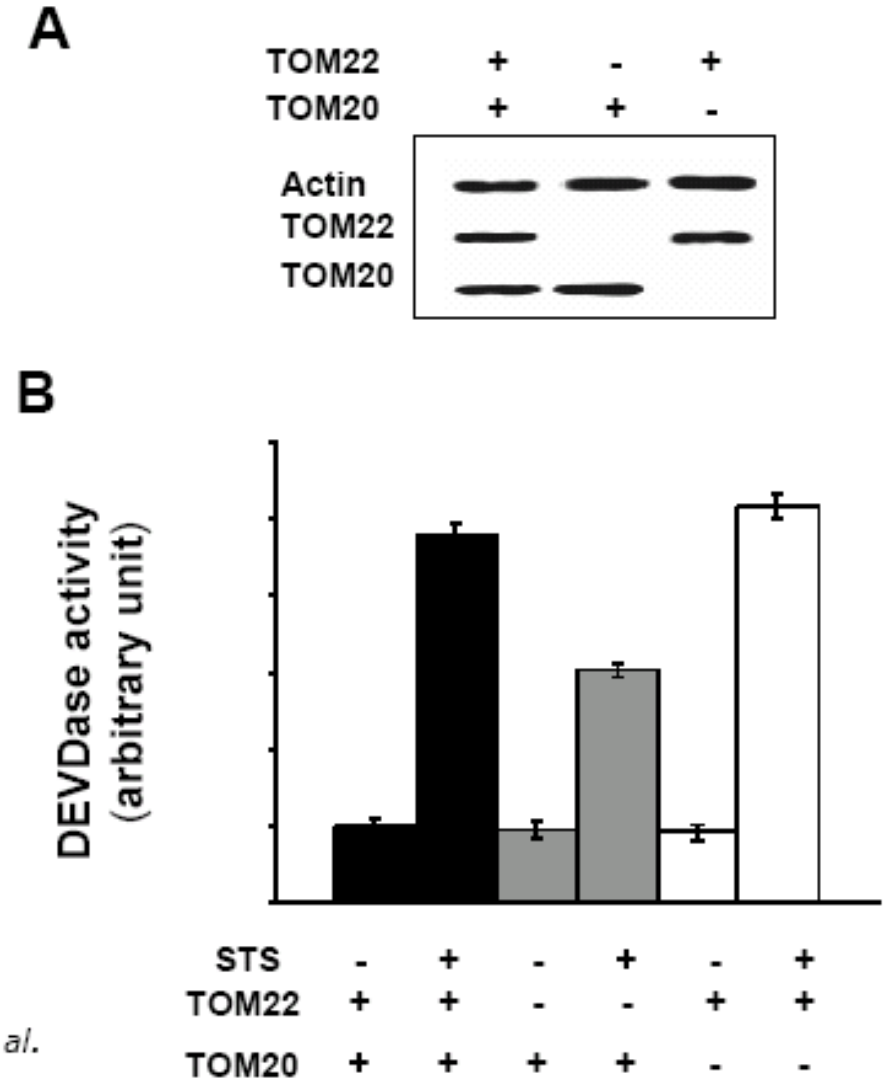


Fig. 5: Bellot *et al.*

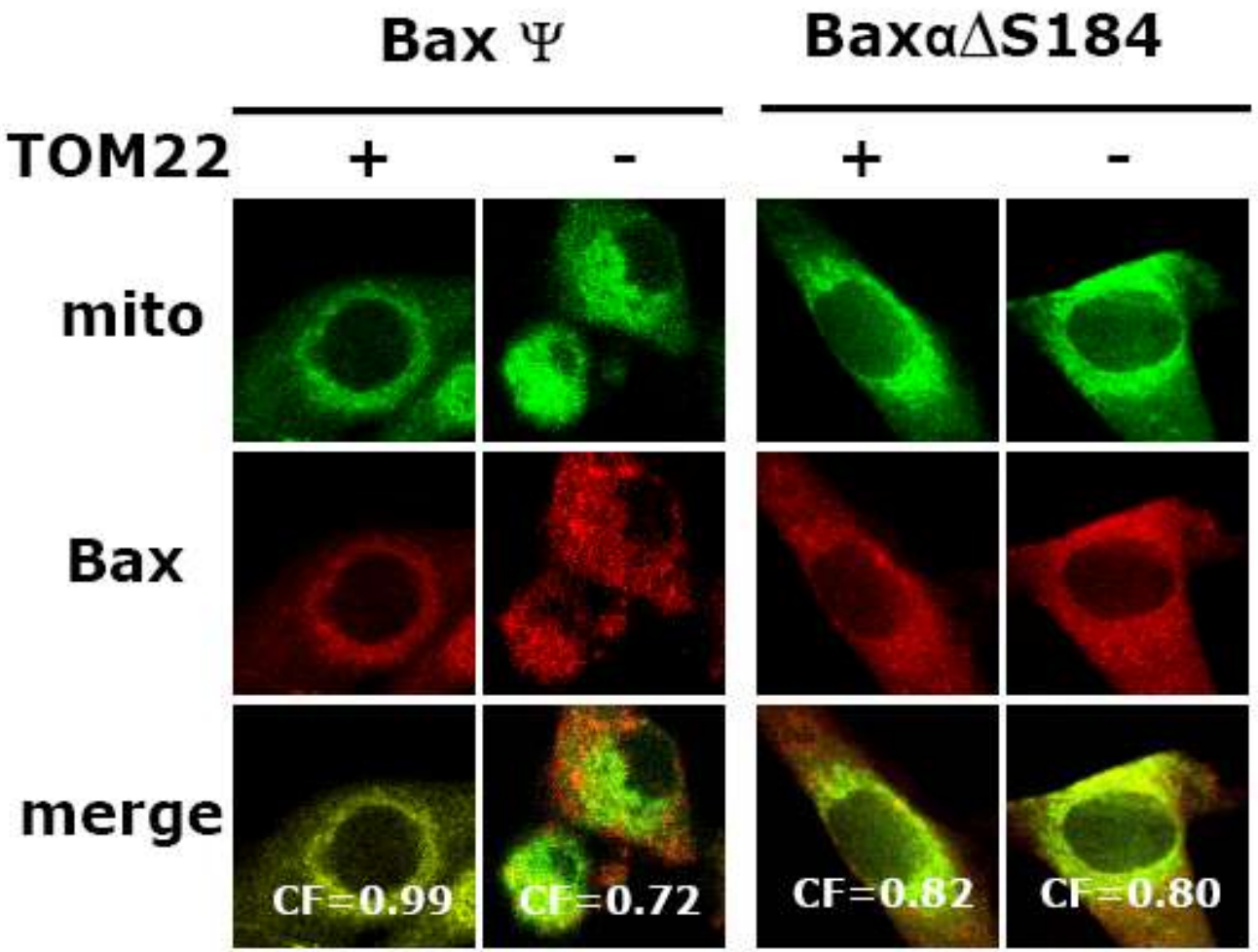


Fig. 6 Bellot *et al.*

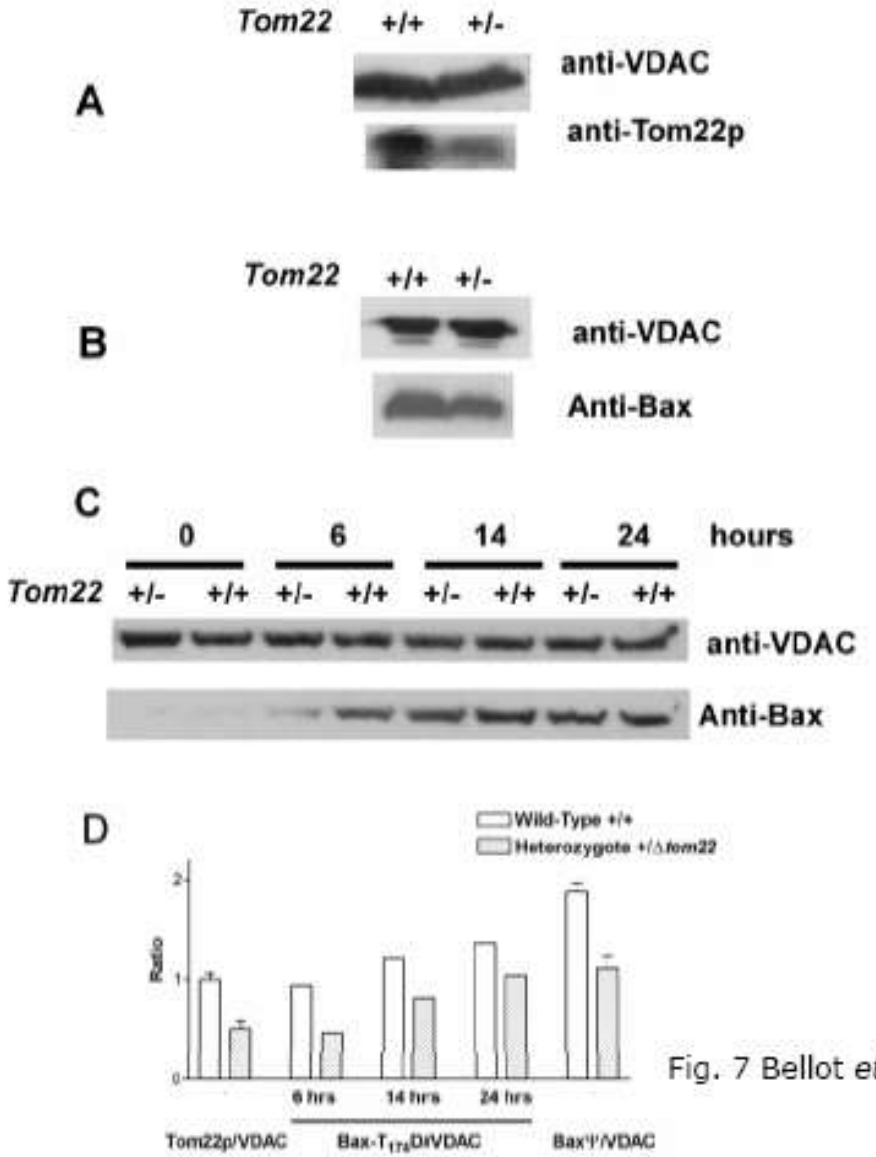


Fig. 7 Bellot *et al.*

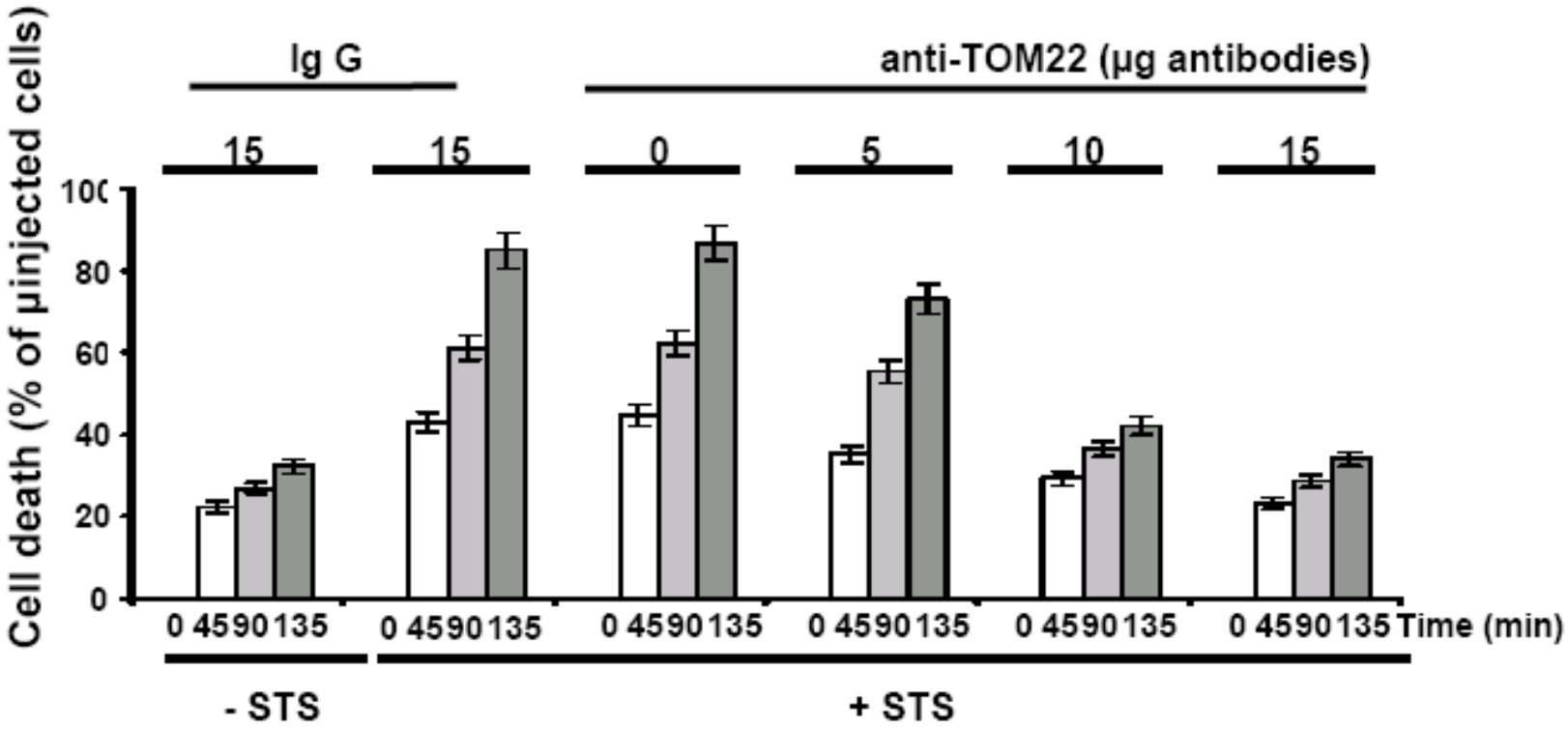


Fig. S1 Bellot *et al.*

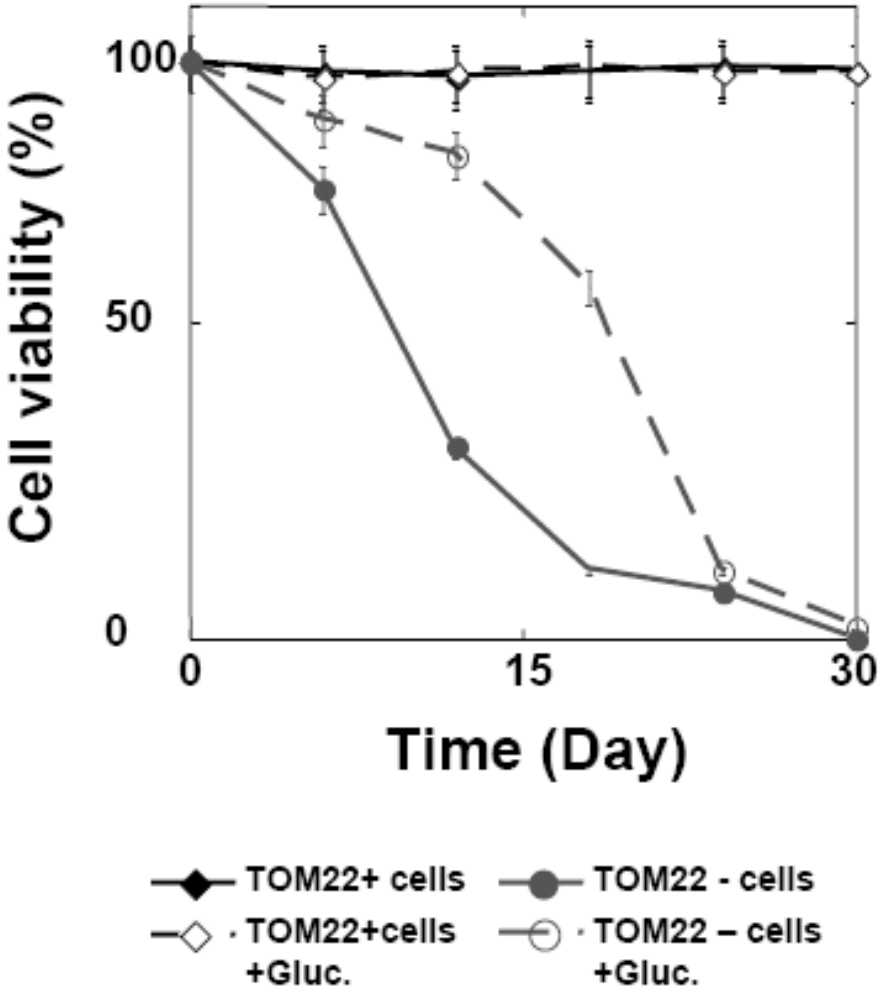


Fig. S2 Bellot *et al.*

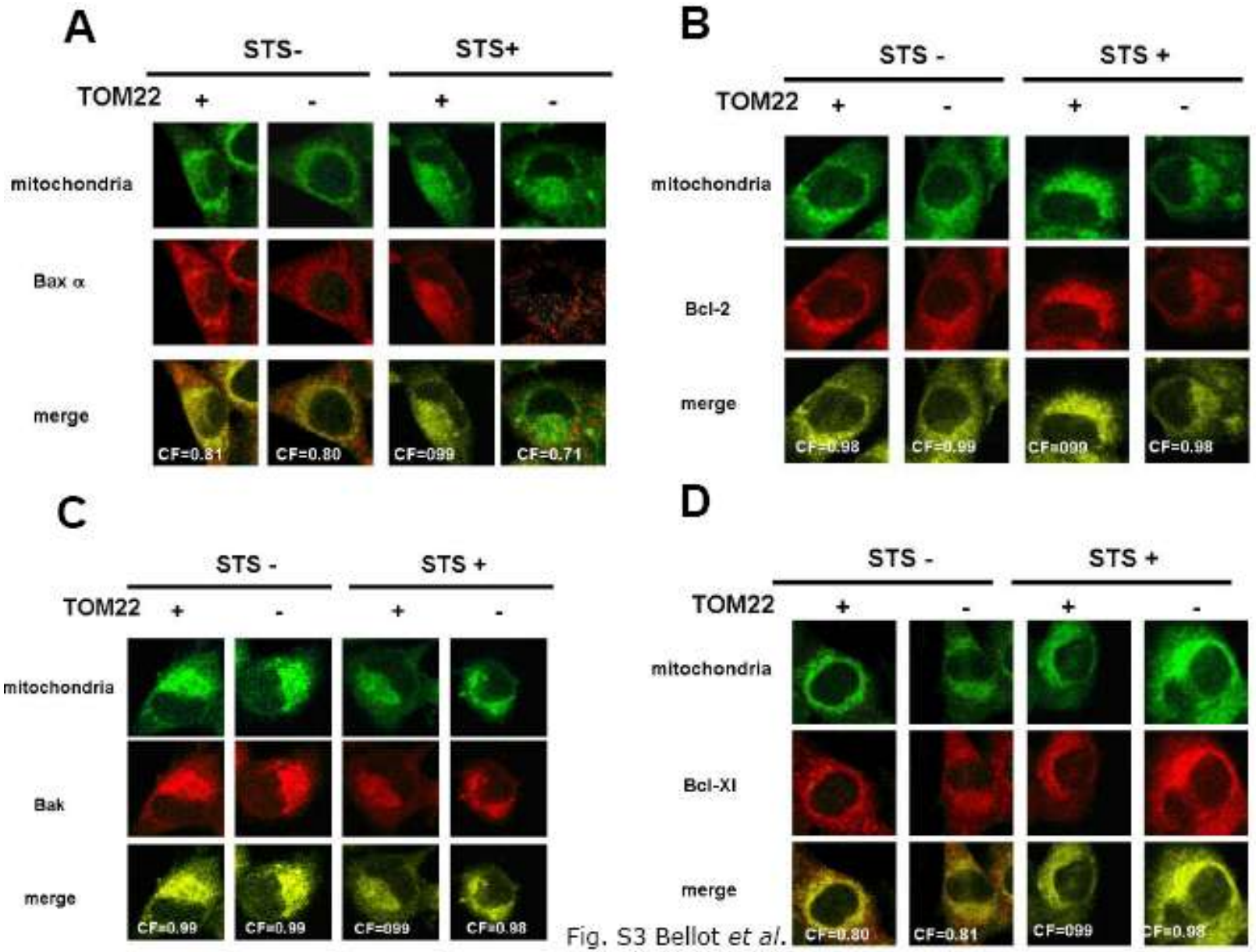


Fig. S3 Bellot *et al.*

C. Commentaires et résultats complémentaires

1. Tom22 est le récepteur mitochondrial de Bax

Comme nous l'avons vu en introduction plusieurs protéines de la membrane externe mitochondriale comme le VDAC (**Shimizu *et al*., 1999**) ou l'ANT (**Marzo *et al*., 1998**) ont déjà été décrites comme possibles récepteurs de Bax. Plus récemment une autre protéine mitochondriale, la protéine MAP-1 (**M**odulator of **Ap**optosis **1**) a été décrite comme étant un effecteur crucial de la mort cellulaire induite par Bax (**Tan *et al*., 2005**). Cependant aucun de ces travaux ne semble vraiment apporter de véritables éclaircissements quant au mécanisme primordial de l'association de Bax avec la membrane externe.

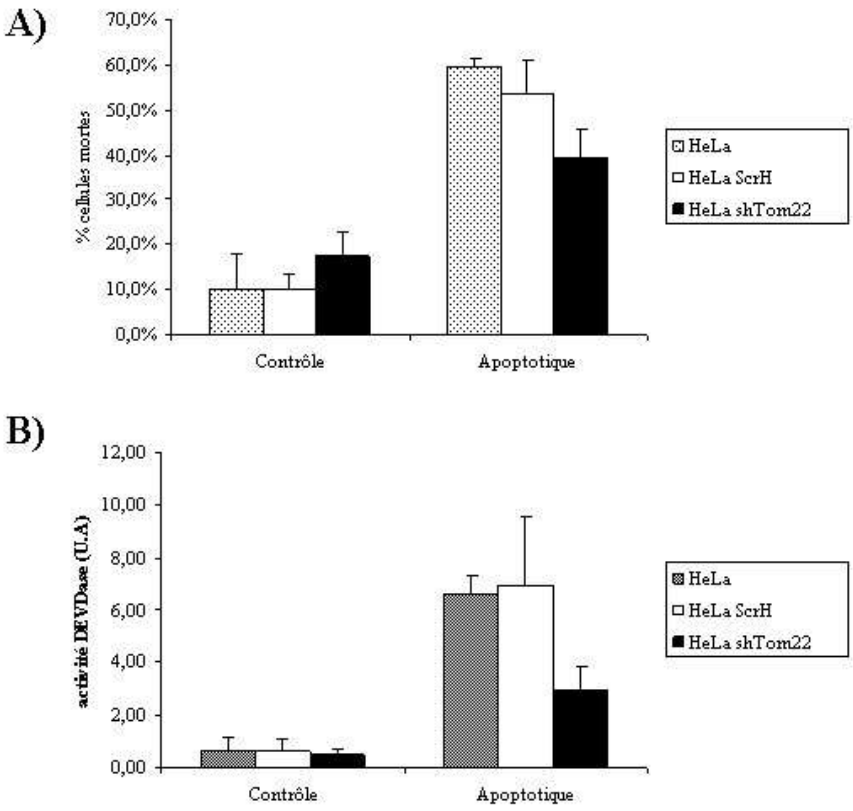


Figure 1: Diminution de l'expression de Tom22 par siRNA dans des cellules HeLa. L'apoptose est induite par traitement des cellules à la doxorubicine à 1 µg/mL pendant 20 heures. Les contrôles utilisés sont les cellules HeLa et des cellules HeLa ScrH exprimant un siRNA inerte. A) évaluation de la mort cellulaire par comptage des cellules en bleu trypan. B) Mesure de l'activité caspase induite par le traitement à la doxorubicine. Les niveaux de mortalité et d'activité caspase entre les cellules shRNA-Tom22 et les cellules contrôles sont significativement différents, $P<0,05$.

Les travaux rapportés dans l'article présenté dans la partie précédente permettent de proposer un mécanisme nouveau de la translocation de Bax. En effet un criblage par la technique de double

hybride a ainsi permis d'identifier la protéine Tom22 en tant que protéine interagissant potentiellement avec Bax. Comme il est explicité dans la partie E.2 de l'introduction, Tom22 appartient au complexe de translocation TOM où il y joue le rôle de récepteur des précurseurs importés. Ceci suggère donc que Bax, lors de son étape de relocalisation mitochondriale, doit emprunter un passage impliquant le complexe d'importation TOM appuyant ainsi le fait que la séquence d'adressage située dans l'Hα1 est une vraie préséquence d'adressage comparable en tout point à celles retrouvées classiquement dans les protéines importées dans la mitochondrie. En outre bien que l'interaction entre Bax et Tom22 soit transitoire comme le montrent les résultats de cross-linking (***article**, figure 2B*), cette étape d'association au récepteur Tom22 est essentielle pour l'étape subséquente de perméabilisation de la membrane externe par Bax. En effet l'utilisation d'anticorps dirigés contre la protéine Tom22 pour saturées des mitochondries isolées inhibe l'association de Bax sur la membrane externe (***article**, figure 3A et 3B*). D'un point de vue fonctionnel la microinjection de ces anticorps dans des cellules GBM induites en apoptose se traduit par l'inhibition de la mort cellulaire (***article**, figure 3C et 3D, figure S1*). Ceci est confirmé par l'extinction de l'expression de Tom22 dans des cellules GBM par transfection d'un « full-length antisens » qui permet la disruption de l'étape précoce d'association de Bax avec la mitochondrie dépendante de Tom22 et ainsi provoque une inhibition de l'apoptose Bax-dépendante (***article**, figure 4*). En outre il faut signaler que l'extinction d'un autre récepteur mitochondrial, la protéine Tom20, n'interfère pas avec la capacité de Bax à induire la mort cellulaire (***article**, figure 5*). Le même type de résultat est obtenu dans un autre modèle cellulaire, les cellules HeLa, dans lequel l'expression de Tom22 a été diminuée par l'emploi de siRNA (**figure 1**). En effet les cellules HeLa exprimant le siRNA dirigé contre Tom22 présentent une plus grande résistance à l'apoptose induite par un traitement à la doxorubicine. L'ensemble de ces résultats permet donc de déduire que, lors de l'induction d'un mécanisme apoptotique, le changement de conformation subit par Bax et conduisant ainsi à son activation le conduit vers sa nouvelle localisation qu'est la membrane externe de la mitochondrie au travers d'une interaction avec un récepteur membranaire, la protéine Tom22. Cette interaction est fondamentale pour la mise en place d'une apoptose Bax-dépendante. De plus il faut noter que cette voie qu'emprunte Bax pour s'associer à la mitochondrie est différente de celle empruntée par la protéine anti-apoptotique Bcl-2 qui s'associe à la membrane externe par une voie empruntant le récepteur Tom20 (**Motz *et al.*, 2002**). L'ensemble de ces données semble conduire à une implication importante du complexe d'importation TOM dans l'association mitochondriale des protéines de la famille de Bcl-2, au moins dans les cas de Bcl-2 et Bax.

2. Domaines de Bax interagissant avec Tom22

La mise en évidence des domaines de Bax impliqués dans l'interaction avec Tom22 par la technique de peptide scan (***article**, figure 2A*) au cours de laquelle le potentiel d'interaction de 91 peptides dérivés de la séquence de Bax avec Tom22 est déterminé révèle que deux séquences sont principalement impliquées (voir l'annexe 1 pour une meilleure résolution de la figure 2A de l'article). Ce résultat confirme donc la capacité qu'ont Bax et Tom22 d'interagir l'un avec l'autre. En revanche cette même expérience montre que Bax et le VDAC n'interagissent pas ensemble. En effet aucun

signal révélant la présence de VDAC sur la membrane contenant les peptides dérivés de Bax n'est détectable ce qui suggère qu'aucun de ces peptides n'a le potentiel pour interagir avec Bax contrairement à ce qui est observé pour Tom22 (figure 2A, 2B). Afin de contrôler la spécificité des interactions ainsi observées, des peptides dérivés de préséquences mitochondriales d'importation ont été utilisés en tant que contrôles. Ces peptides contrôles sont dérivés des séquences signales de l'aldéhyde déhydrogénase, de l'ornithine transcarbamylase et de la sous-unité IV de la cytochrome oxydase. L'utilisation de ces contrôles montrent bien que Tom22 interagit avec ces peptides dérivés de séquences signales comme il est attendu mais que le VDAC n'interagit pas avec ces peptides contrôles (figure 2C). Ce contrôle valide donc la spécificité de l'interaction entre Tom22 et les séquences peptidiques de Bax déposés sur la membrane ainsi que l'absence d'interaction observée dans le cas du VDAC. Il faut toutefois noter dans le cas de Tom22 que les intensités de liaison détectées au niveau des peptides dérivés de préséquences mitochondriales semblent moins importantes que celles mesurées pour le test avec les peptides issus de Bax. Ceci peut s'expliquer par le fait que ces préséquences ne sont pas complètes. En effet une préséquence d'adressage est en générale composée de 20 à 30 résidus, cependant les limites de l'utilisation du synthétiseur de peptide n'ont pas permis la synthèse complète de telles séquences signales. Les peptides contrôles représentent donc seulement une portion de préséquence correspondant à 12 résidus du signal d'adressage expliquant donc ainsi que l'interaction avec Tom22 ne soit pas optimale. Dans la mesure où il n'apparaît aucune interaction potentielle entre VDAC et Bax, ces résultats semblent donc invalider définitivement l'hypothèse du groupe de Tsujimoto (**1999**) selon laquelle Bax, au travers d'une interaction avec VDAC, modulerait la perméabilité mitochondriale.

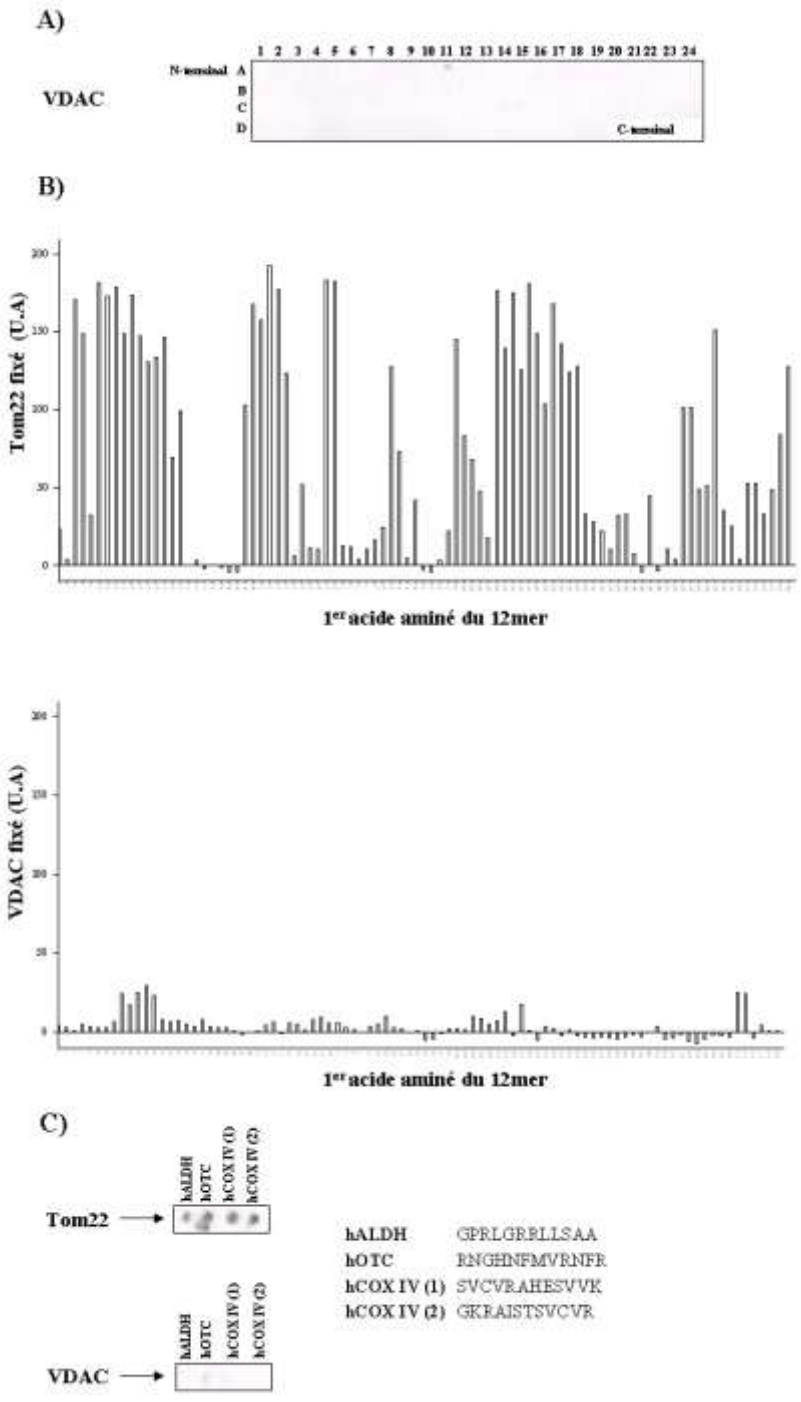


Figure 2: Peptide scan. A) analyse de l'interaction du VDAC avec les différents peptides dérivés de Bax. B) interaction de Tom22 et de VDAC avec des peptides dérivés de préséquences mitochondriales. C) données brutes de quantification du Tom22 ou du VDAC lié à chaque peptide dérivé de la séquence de Bax.

Comme il est dit dans le paragraphe précédent l'analyse des zones d'interaction entre Bax et Tom22 a permis de mettre en évidence deux domaines de Bax présentant une forte affinité pour Tom22. Le premier domaine ainsi trouvé est, sans surprise, l'hélice α1 qui renferme la séquence d'adressage mitochondriale de Bax. Ceci permet donc de confirmer que Bax suite à son activation est transloqué/importé vers la mitochondrie via le complexe TOM en tant que substrat du récepteur de

préprotéines Tom22. Le second domaine de Bax ayant un fort potentiel d'interaction avec Tom22 est également très intéressant puisqu'il s'agit de la région reliant les hélices Hα5 et Hα6. Comme il a déjà été exposé précédemment ces deux hélices hydrophobes représentent le domaine d'insertion de Bax dans la membrane mitochondriale et constituerait la base structurale des pores formés par Bax. Le fait que la séquence « linker » entre ces deux hélices soit directement impliquée dans l'interaction avec Tom22 permet d'envisager une voie d'insertion membranaire de Bax qui soit dépendante du complexe TOM. Ceci suggère donc que la simple exposition de domaines hydrophobes suite à un changement de conformation n'est pas suffisante pour conduire à l'insertion membranaire de Bax mais que ce mécanisme peut nécessiter une prise en charge par la machinerie de translocation de la membrane externe mitochondriale.

D. Mise en évidence de complexes protéiques mitochondriaux contenant Bax

1. Impact du statut d'oligomérisation de Bax sur sa capacité de perméabilisation

La propriété de Bax de former des homo-oligomères dans la membrane externe mitochondriale constitue le point fondamental pour l'étape de perméabilisation observée lors de l'apoptose (**Antonsson *et al*., 2000**). Les oligomères de Bax se forment uniquement dans un environnement membranaire après induction de l'apoptose (**Antonsson *et al*., 2001**) et la dimérisation forcée de Bax conduit inévitablement à son insertion membranaire (**Gross *et al*., 1998**). Les travaux de Antonsson décrivant des complexes de haut poids moléculaires formés par Bax lors de l'apoptose ainsi que le modèle de Saito dans lequel Bax forme des canaux différents selon son niveau d'oligomérisation (**Saito *et al*., 2000**) suggèrent qu'une fois inséré, Bax doit être à l'origine de la formation de plusieurs types de structures.

Le but du travail suivant a été de mettre en évidence les différents types de complexes formés par Bax précocement dans la membrane externe mitochondriale suivant sa relocalisation afin de mieux comprendre l'évolution ultrastructurale que subit le Bax mitochondrial au cours de l'apoptose. Dans un premier temps la capacité de fractions monomériques ou oligomériques de Bax activé par le pH à induire la libération du cytochrome c a été testé sur des mitochondries isolées. Après avoir été traité à pH 6,0, du Bax

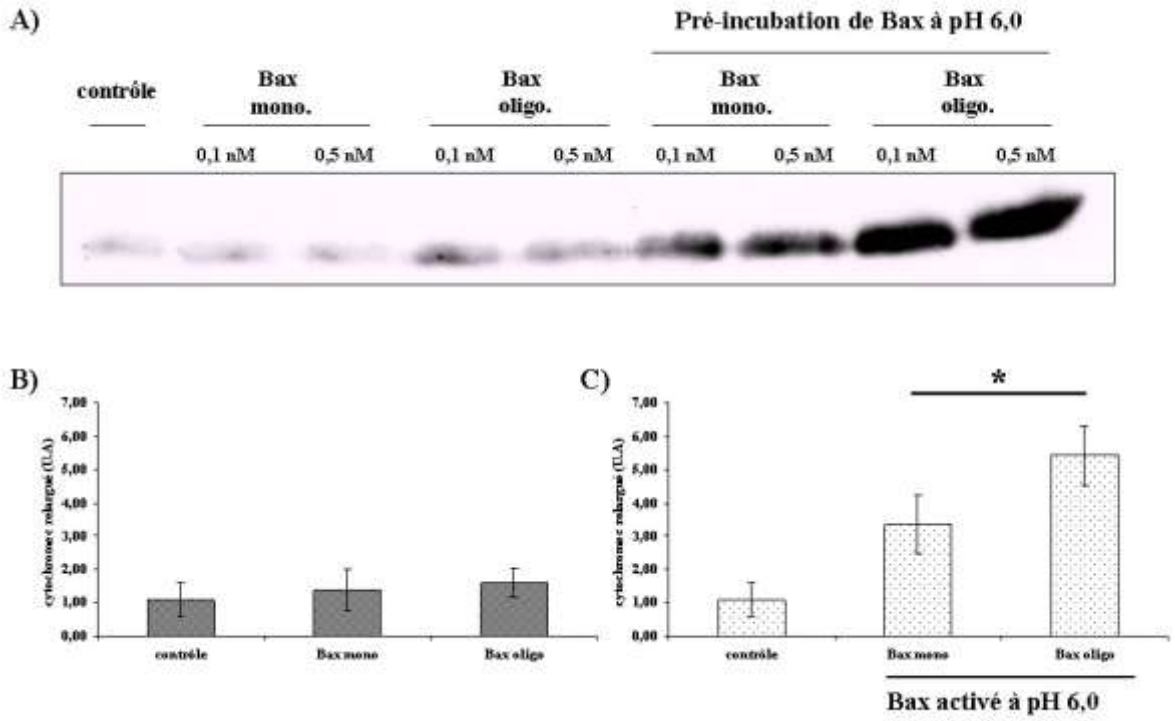


Figure 3: Etude du potentiel de perméabilisation de fractions monomériques ou oligomériques de Bax activé à pH 6,0 sur mitochondries isolées de foie de rat. A) western-blot réalisé sur les surnageants des tests acellulaires pour détecter la libération du cytochrome c selon le type de traitement subit par les mitochondries. B) quantification du cytochrome c relargué dans les surnageants par des mitochondries non traitées ou incubées avec une fraction monomérique ou oligomérique de Bax (0,1 nM). Aucune différence significative n'est observé selon le type de traitement. C) quantification du cytochrome c relargué dans les surnageants par des mitochondries non traitées ou incubées avec une fraction monomérique ou oligomérique de Bax (0,1 nM) qui a subit un prétraitement à pH 6,0 pour être activé. Le niveau de cytochrome c libéré détecté est significativement plus élévé pour les mitochondries traitées par Bax que pour le contrôle mais la différence est également significative entre le traitement avec les monomères et le traitement par les oligomères ($P<0,05$).

recombinant His-taggé a été filtré au travers d'une membrane ayant un cut-off de 30 kDa pour séparer la fraction monomérique et la fraction oligomérique. Dans le même temps des fractions monomériques et oligomériques contrôles de Bax non activé ont été isolées afin d'évaluer, lors des tests acellulaires, le potentiel de perméabilisation intrinsèque du Bax recombinant purifié résultant qui pourrait être dû à un mauvais repliement d'une fraction de protéines purifiées lors de l'étape de renaturation (voir matériel et méthodes). L'activité de ces fractions a ensuite été testée sur des mitochondries isolées, puis évaluée en quantifiant les niveaux de cytochrome c relargués dans les surnageants des tests acellulaires (figure 3). L'analyse de ces surnageants par western blot (figure 3A) montre bien un différentiel dans les quantités de cytochrome c libéré: très faible dans les cas où Bax n'a pas été activé et nettement plus important lorsque Bax a subit un traitement à pH 6,0. Ceci est confirmé par la quantification du cytochrome c ainsi relargué (figure 3B) puisque dans le cas des fractions monomériques et oligomériques de Bax non activé le niveau de cytochrome c libéré est négligeable par rapport au surnageant contrôle. En revanche quand du Bax traité à pH 6,0 est utilisé (figure 3C) la quantité de cytochrome c libéré devient importante comme il est attendu mais ce qui est le plus

intéressant c'est que l'on observe une différence significative de cytochrome c libéré entre un surnageant de mitochondries traitées par du Bax monomérique traité au pH et un surnageant de mitochondries traitées par une fraction oligomérique de Bax activé par le pH. Ainsi les oligomères de Bax présentent un pouvoir de perméabilisation plus important que le monomère actif. De cette façon, en forçant l'oligomérisation de Bax par le pH avant de l'incuber avec des mitochondries et en le comparant à l'activité d'un Bax actif monomérique, il apparaît que Bax semble s'assembler en différents types de structures oligomériques. Ces différents complexes ne montrent pas la même capacité à perméabiliser la membrane externe mitochondriale comme le montre la figure 4, ce qui reste en accord avec les modèles d'action de Bax les plus récemment décrits. En outre les niveaux de perméabilité augmentant en parallèle du niveau d'oligomérisation de Bax s'accordent également avec les cinétiques de libération distinctes observées pour les différents facteurs apoptogéniques de l'espace intermembranaire. En effet le travail de Saito *et al.* (**2000**) montre que le dimère de Bax peut former un canal d'un diamètre de 11 Å alors qu'un tétramère forme un canal de 22 Å susceptible d'être perméant au cytochrome c. Ce qu'il peut donc être déduit c'est que Bax, une fois inséré, semble induire la formation de pores dont la structure évolue au cours du temps ce qui résulte en une augmentation de la perméabilité progressive se traduisant par la libération rapide de protéines de petites tailles dans un premier temps (cytochrome c, DDP/TIMM8a) et plus lente voire différée pour des protéines de plus grande taille (Smac/DIABLO, HtrA2/OMI). Pour résumer, la perméabilisation dépendante de Bax n'apparaît pas être la conséquence de la formation d'un seul type de pore mais plutôt la résultante d'une structure évolutive menant à une augmentation croissante de la perméabilité mitochondriale dans le temps.

2. Complexes mitochondriaux formés suivant la translocation de Bax

Dans la mesure où l'activité de Bax semble impliquer plusieurs types de complexes, partant de l'étape d'association avec Tom22 puis impliquant l'homo-oligomérisation croissante liée a une augmentation de la perméabilité, il est intéressant de mettre en évidence les entités protéiques concernées dans le contexte de la membrane mitochondriale afin d'avoir une idée plus claire de l'évolution des mécanismes apoptotiques sous-jacents à la translocation de Bax. L'étude de ces complexes formés précocement après la translocation de Bax a été réalisée en utilisant des mitochondries isolées incubées avec du Bax recombinant ou du Bax recombinant activé par le pH; les complexes mitochondriaux formés ont ensuite été analysés en utilisant une technique de gels en deux dimensions permettant de séparer les complexes lors d'une première électrophorèse réalisée en conditions natives suivie d'une seconde électrophorèse en conditions dénaturantes afin de séparer les composants de ces complexes.

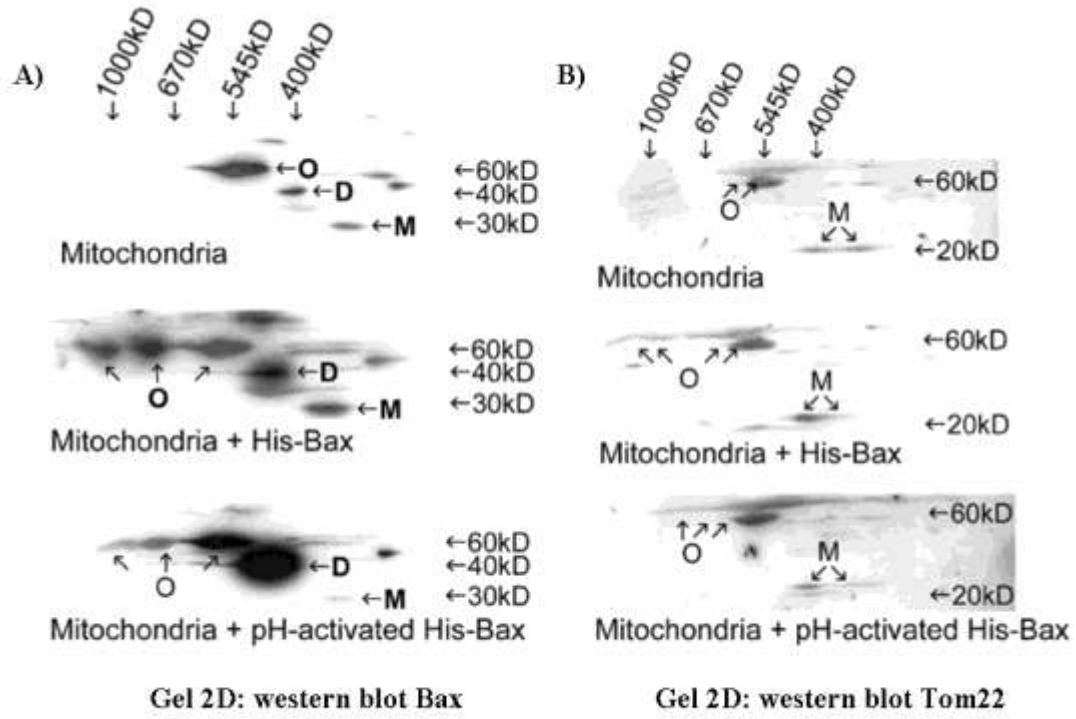


Figure 4: Caractérisation des complexes protéiques mitochondriaux formés par Bax suite à sa translocation dans la membrane externe. Les gels 2D sont réalisés à partir de tests acellulaires sur des mitochondries de foie de rat; la séparation des complexes est réalisée par la technique de BN-PAGE puis après dénaturation les différents composants des complexes sont séparés par SDS-PAGE. Trois conditions sont utilisées: une condition avec des mitochondries seules permettant d'analyser le comportement du Bax endogène, une condition où les mitochondries sont incubées avec 0,1 nM de Bax recombinant His-taggé et une dernière conditions où les mitochondries sont traitées avec 0,1 nM de Bax activé à pH 6,0 A) détection des complexes mitochondriaux contenant Bax par western blot. B) détection des complexes mitochondriaux contenant Tom22 par western blot. Il faut noter que les conditions de dénaturation entre la BN-PAGE et la SDS-PAGE n'apparaissent pas comme étant optimales ce qui semble avoir pour conséquence de maintenir certaines interactions fortes entre protéines et donc les protéines analysées apparaissent à plusieurs niveaux de poids moléculaires, ces différentes formes sont notées M (monomère), D (dimère) et O (oligomère).

L'analyse des complexes ainsi réalisée a permis d'avoir une idée sur les types de complexes contenant Bax. En effet l'analyse de Bax permet d'identifier plusieurs complexes au niveau de la mitochondrie. Dans un premier temps l'analyse de seules mitochondries isolées a permis d'observer le comportement de la fraction mitochondriale de Bax retrouvée sur la mitochondrie même en conditions non apoptotiques. En effet on retrouve le Bax endogène présent essentiellement dans un complexe d'environ 545 kDa puis très minoritairement dans un complexe de 400 kDa et d'autres complexes de plus bas poids moléculaire (figure 4A). Dans les conditions utilisées pour dénaturer les complexes avant de réaliser la seconde séparation il faut noter que ces conditions ne permettent pas une déanturation totale de tous les éléments des complexes observés; de cette façon il apparaît que des interactions que l'on peut qualifier de « fortes » entre deux protéines ou plus ne sont pas dénaturées ce qui explique que le Bax détecté dans les 3 complexes migre à différents niveaux de masses moléculaires. Ainsi le Bax du complexe de 545 kDa semble faire partie d'un « sous-

complexe » de 60 kDa tandis que celui du complexe de 400 kDa appartient à un « sous-complexe » de 40 kDa qui semblerait donc représenter un dimère de Bax. Pour le reste du Bax endogène il migre essentiellement en tant que monomère après dénaturaration. Lorsque du Bax recombinant non activé est ajouté aux mitochondries, les complexes observés sont les même que pour le Bax endogène mais avec en plus deux complexes de haut poids moléculaire, de 700 kDa et 900 kDa environ, qui apparaissent (figure 4A). Le « sous complexe » de 60 kDa est toujours présent dans le complexe de 545 kDa mais également dans les deux nouveaux complexes de 700 et 900 kDa, quand au dimère de 40 kDa et au monomère ils sont toujours présents respectivement dans les complexes de 400 kDa et de plus bas poids moléculaire. Dans ces conditions il y a donc très peu de changement par rapport à la situation du Bax endogène même au niveau de la quantité de Bax associé à la mitochondrie ce qui est attendu compte tenu que le Bax recombinant n'a pas été activé. En outre les légères différences observées peuvent être attribuées à l'apport exogène de Bax recombinant et à une petite proportion de ce dernier qui aurait été activé lors de la purification. Le plus intéressant se produit donc lorsque les mitochondries sont traitées avec du Bax activé par le pH (figure 4A). On retrouve les complexes de 900, 700, 545 et 400 kDa alors que les complexes de plus faible poids moléculaire disparaissent presque entièrement. La proportion de complexes de 900 et 700 kDa est plus faible également que dans le cas où un Bax non actif est utilisé. Le bax activé s'accumule donc essentiellement dans les complexes de 545 et 400 kDa sous la forme d'un « sous-complexe » de 60 kDa dans le complexe de 545 kDa et d'un dimère dans le complexe de 400 kD. Il peut être postulé que le Bax du complexe de 400 kDa est bien dimérique car l'accumulation dans ce complexe est véritablement très importante, or des travaux précédents suggèrent fortement que la forme active de Bax est essentiellement un homo-dimère de Bax inséré dans la membrane mitochondriale (**Gross *et al*., 1998**).

L'analyse de la localisation du récepteur de Bax, Tom22, a également été réalisée dans les mêmes conditions que pour Bax. Dans le cas des mitochondries seules Tom22 se trouve essentiellement dans les mêmes complexes contenant le Bax endogène: essentielement un complexe de 545 kDa et un complexe de 400 kDa. Dans le cas du complexe de 545 kDa Tom22 appartient au « sous-complexe » de 60 kDa qui serait donc composé au moins de Bax et Tom22. Dans le cas du complexe de 400 kDa Tom22 est résolu essentiellement en tant que monomère, donc peu lié, ce qui soutient le fait que dans ce complexe la forme de Bax observé est bien une forme dimérique. Dans les conditions où les mitochondries sont incubées en présence de Bax non actif, Tom22 est retrouvé également dans les mêmes complexes que Bax sous la forme du « sous-complexe » de 60 kDa dans les complexes de 900, 700 et 545 kDa et sous une forme monomérique dans le complexe de 400 kDa. Lorsque du Bax activé par le pH est incubé avec les mitochondries isolées, la protéine Tom22 suit la même évolution observée pour Bax c'est à dire que les complexes de haut poids moléculaire (900 et 700 kDa) diminuent et Tom22 est alors surtout observé dans le complexe de 545 kDa où il interagit fortement avec Bax dans le « sous-complexe » de 60 kDa. Tom22 se retrouve aussi un peu dans le complexe de 400 kDa où il semble être peu lié à Bax qui lui, dans ce complexe, se trouve surtout sous forme dimérique. L'ensemble de ces résultats conduit donc à penser que Bax, dans un premier temps s'associe à des complexes de haut poids moléculaire (900, 700 et 545 kDa) où se trouve son récepteur Tom22 avec lequel il interagit au sein d'un « sous-comlexe » de 60 kDa. Cet

intermédiaire de 60 kDa pourrait se composer d'une molécule de Bax et de deux molécules de Tom22 ou inversement de deux molécules de Bax et une molécule de Tom22. Il est possible également possible qu'une troisième protéine soit incluse dans cet intermédiaire de 60 kDa: parmi les candidats possible on peut imaginer Bcl-2 qui interagit avec Tom20 et est donc susceptible de se trouver au niveau du complexe TOM lors de la translocation de Bax. Ceci pourrait alors représenter un point de régulation de l'activité de Bax par la formation facilitée d'hétéro-dimères Bax/Bcl-2 dû à un rapprochement physique induit par la présence de leurs récepteurs respectifs dans le même complexe. En outre il semble que ces complexes de haut poids moléculaires évoluent plutôt dans le sens de l'accumulation du complexe de 545 kDa au détriment des deux autres complexes de 900 et 700 kDa. Cela peut suggérer leur rôle dans l'insertion membranaire de Bax de façon assez semblable au mécanisme observé lors de l'importation et l'assemblage membranaire de protéines par le complexe TOM. Afin de vérifier si le complexe TOM peut être impliqué dans ces complexes de haut poids moléculaires, la même analyse que pour Bax et Tom22 a été réalisée pour la sous-unité canal Tom40 qui forme avec Tom22 le cœur du complexe TOM (figure 5A). L'analyse de la localisation de Tom40 sur des mitochondries isolées seules ou incubé avec du Bax recombinant non activé révèle que Tom40 est retrouvé justement dans ces complexes de 900, 700 et 545 kDa avec une présence majoritaire dans le complexe de 545 kDa (figure 5A). Ceci va donc dans le sens d'un rôle important du complexe TOM dans l'insertion membranaire d'un Bax actif et également d'une possible régulation par Bcl-2 à ce niveau. Le résultat de la fonction de ces complexes, surtout le complexe de 545 kDa, serait la formation d'un complexe de 400 kDa contenant essentiellement du Bax dimérique qui serait lui responsable de la perméabilisation membranaire. Si des hétérodimères Bax/Bcl-2 sont formés au niveau des complexes de haut poids moléculaires, il est possible d'imaginer que ces hétérodimères pourrait se retrouver aussi dans ce complexe de 400 kDa.

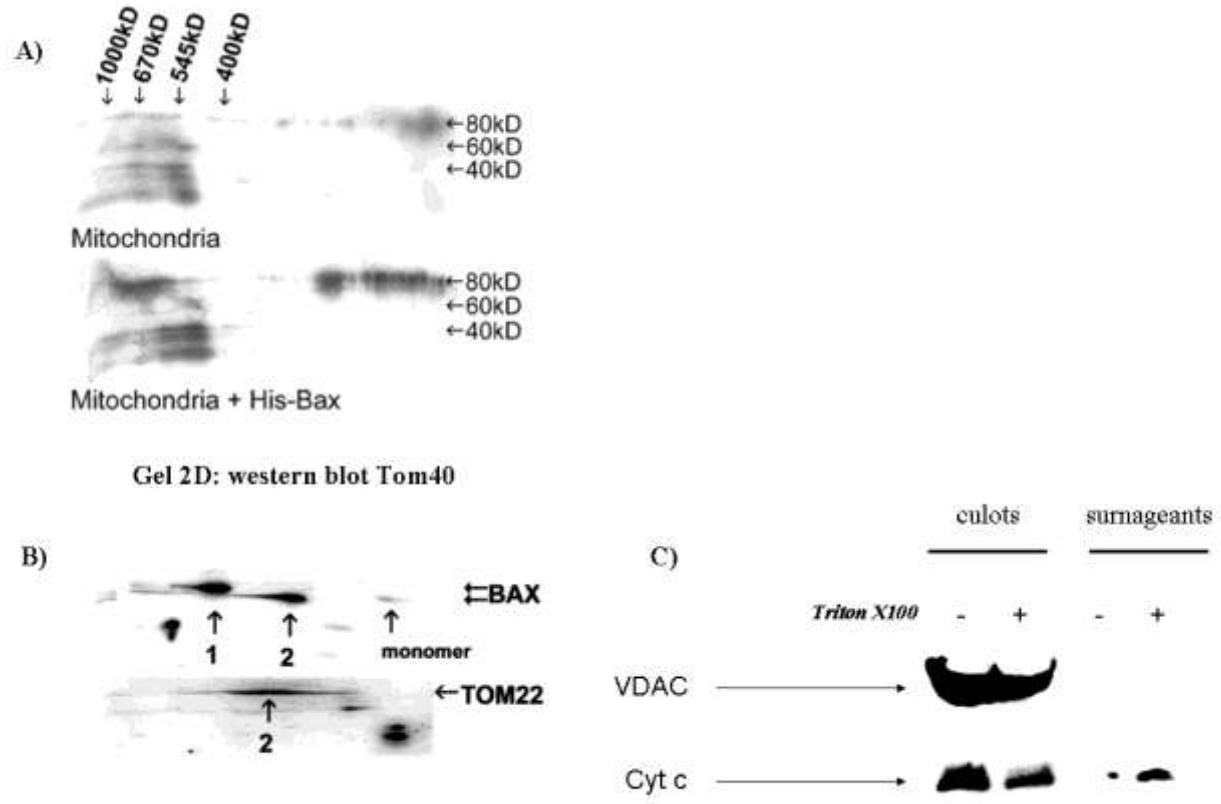


Figure 5: identification des complexes mitochondriaux contenant Tom40 et mise en évidence de complexes formés par du Bax pré-activé au triton X100. A) gel 2D réalisées à partir de mitochondries de foie de rat et détermination des complexes contenant Tom40. B) analyse des complexes formés dans des mitochondries isolées de foie re rat par du bax pré-activé avec du triton X100. Localisation de Bax et Tom22 dans ces complexes par la technique de gel 2D. Des complexes d'environ 600 kDa (**1**) et plus ainsi qu'un complexe d'environ 400 kDa (**2**) sont ainsi retrouvés pour Bax ainsi qu'un complexe de 400/500 kDa (**2**) pour Tom22. C) Analyse par western blot de la quantité de cytochrome c dans les culots mitochondriaux et dans les surnageants des tests acellulaire afin d'évaluer l'activité de Bax traité au triton X100.

ɱ

été traité avec 0,2 % de triton X100, condition de détergent qui a été décrite comme induisant les changements de conformation précoces de Bax ainsi que sa dimérisation (**Hsu & Youle, 1997**) (**Hsu & Youle, 1998**). L'analyse des complexes formés suite à l'incubation de mitochondries isolées avec du Bax pré-activé avec du Triton X100 révèle ainsi que Bax est retrouvé dans le même types de complexes que lors de son activation par le pH (figure 5B). Ainsi on retrouve Bax dans des complexes de haut poids moléculaires avec une accumulation forte dans un complexe (noté 1 dans la figure 5B) que l'on peut apparenter au complexe de 545 kDa identifier précédemment. Un second complexe (noté 2 dans la figure 5B) peut quand à lui être identifier comme étant celui de 400 kDa. Une faible fraction de Bax est détecter dans les bas poids moléculaire et peut être assimiler à une forme monomérique. En ce qui concerne Tom22 on le retrouve dans l'ensemble des complexes mais essentiellement dans une zone comprenant les complexes ou Bax est retrouvé principalement (zone notée 2 dans la figure 5B). Ainsi en utilisant un second type d'activation de Bax, les même types de complexes mitochondriaux sont retrouvés.

Enfin dans le but de confirmer l'existence des complexes protéiques mis en évidence par l'utilisation de mitochondries de foie de rat et de Bax recombinant, le même type d'analyse par gel 2D

a été réalisé mais cette fois à partir d'un modèle plus physiologique puisque cela a été fait à partir de mitochondries de cellules induites en apoptose par un traitement à la staurosporine. Les résultats obtenus ainsi vont dans le même sens que dans le cas des tests acellulaires (figure 6A). En effet en ce qui concerne Bax on le retrouve dans des complexes de haut poids moléculaire avec une forte accumulation dans un complexe que l'on associer au complexe de 545 kDa décrit précédemment. En outre Tom22 est retrouvé aussi dans ces complexes de haut poids moléculaire et principalement dans le complexe de 545 kDa ce qui est en parfait accord avec les résultats précédents. Pour ce qui est des autres complexes contenant Bax on retrouve un complexe d'environ 400 kDa dans lequel on ne détecte pas de Tom22 ce qui là encore concorde avec les résultats précédents pour lesquels Bax activé s'accumulait essentiellement dans un complexe de 400 kDa. La différence majeure ici réside dans le fait que l'on observe une grande quantité de Bax présente dans des complexes de bas poids moléculaire. Ceci peut s'expliquer de plusieurs façons, la première étant due principalement à la différence entre système cellulaire et système acellulaire. Il est possible de que les conditions utilisées pour analyser les mitochondries de cellules HeLa apoptotiques ne reflètent pas le même stade de l'action de Bax. En effet il se peut que dans ce cas on se trouve

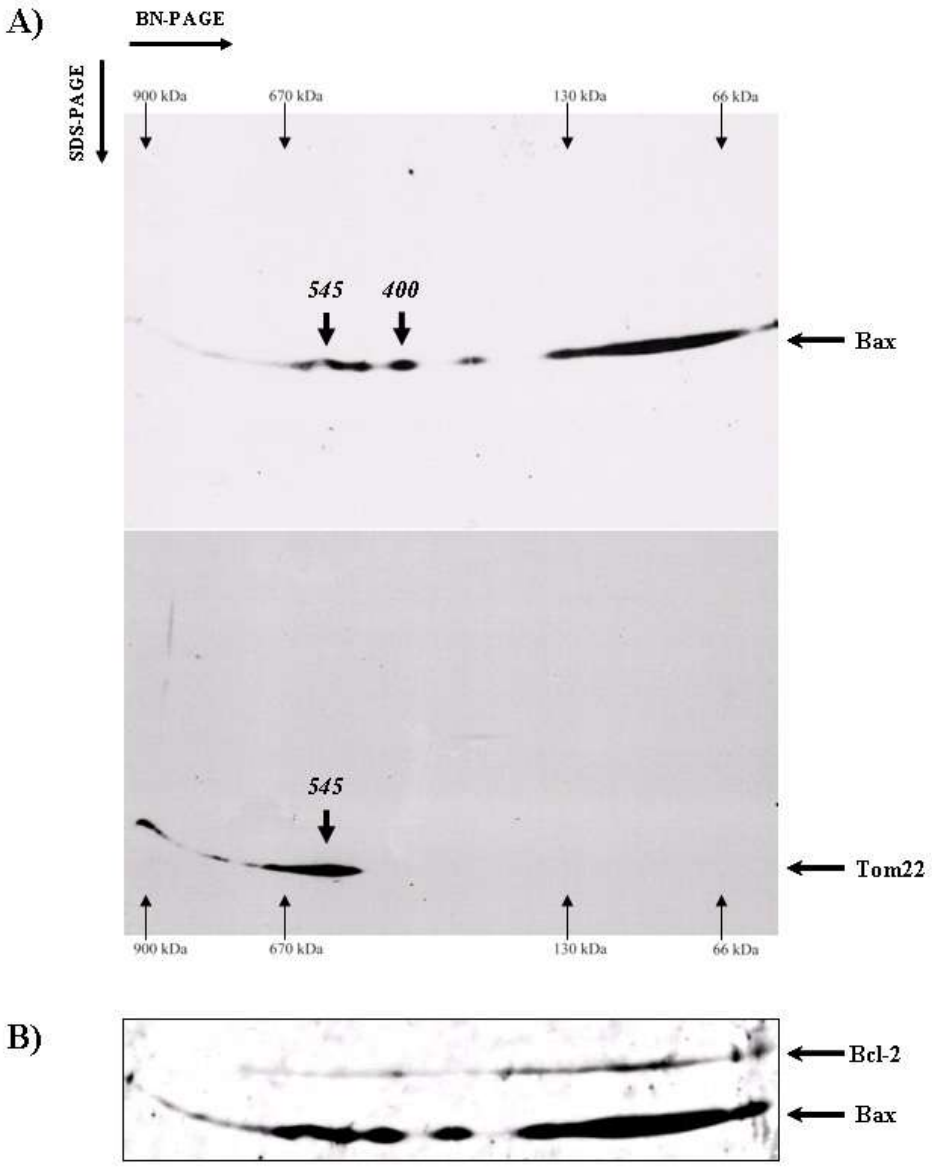


Figure 6: Analyse par gels 2D réalisés à partir de mitochondries de cellules HeLa traitées à la staurosporine. A) Analyse par western blot de la localisation de Bax et Tom22 au sein de complexes mitochondriaux après induction de l'apoptose. B) localisation de Bcl-2 dans les mitochondries de HeLa apoptotiques.

dans un stade plus précoce que celui des conditions acellulaires et que dans ce cas Bax ne s'est pas encore assemblé en oligomères de haut poids moléculaire. De façon assez intéressante l'analyse de Bcl-2 dans ces mitochondries suggère que cette protéine anti-apoptotique est essentiellement présente au niveau des complexes de bas poids moléculaire où Bax est retrouvé (figure 6B). Ceci pourrait donc signifier que dans ces conditions on se trouve encore à un stade où l'action de Bax est encore tamponnée par Bcl-2 et donc que l'on se trouve dans des conditions d'association de Bax à la mitochondrie plus précoce que dans les conditions des tests acellulaires. La formation d'hétéro-dimères Bax/Bcl-2 constituerait alors un frein à l'assemblage de Bax en oligomères de haut poids moléculaires.

E. Modèle d'association de Bax avec la mitochondrie au cours du processus apoptotique

A la vue des résultats énoncés ci-dessus il est possible de proposer une description du mode d'association de Bax avec la mitochondrie lors de l'induction de l'apoptose, son insertion et la formation de pores (figure 7). Après avoir subi un changement de conformation dévoilant entre autre son signal d'adressage mitochondrial localisé dans l'Hα1 Bax est relocalisé vers la mitochondrie où il interagit avec son récepteur Tom22 via son Hα1 et la région « linker » entre ses hélices Hα5 et Hα6. A ce moment là Bax serait pris en charge par le complexe TOM via son interaction avec Tom22, formant des complexes de haut poids moléculaire et menant principalement à l'accumulation d'un complexe de 545 kDa. Ces gros complexes protéiques pourraient alors être impliqués dans le mécanisme d'insertion membranaire de Bax. C'est également à ce niveau que pourrait se situer un point de régulation de l'activité de Bax au travers de la formation d'hétéro-dimères Bax/Bcl-2 au niveau du complexe TOM car Bcl-2 interagit avec Tom20, un composant du complexe TOM. Les hétéro-dimères ainsi formés constitueraient un frein à l'association de Bax en oligomères de haut poids moléculaires, retrouvés au sein d'un complexe de 400 kDa, et favoriseraient ainsi le maintien de Bax au sein d'oligomères de moindres tailles. L'existence du dimère Bax/Bcl-2 serait donc un frein à la formation du complexe de 400 kDa. Cependant au fur et à mesure de l'accumulation de Bax au niveau de la mitochondrie, le pouvoir tampon de Bcl-2 finirait par être dissipé et Bax pourrait alors s'assembler massivement au sein d'un complexe de 400 kDa constitué par l'association d'homo-dimères de Bax. Ce complexe de 400 kDa entraînerait alors une augmentation conséquente de la perméabilité mitochondriale résultant par la libération de facteurs apoptogéniques comme le cytochrome c et Smac/DIABLO. Il a été également démontré que Bax possède la capacité de s'auto-activer (**Tan *et al*., 2006**) dans le sens où un monomère de Bax inséré dans la membrane mitochondriale et exposant son domaine BH3 vers le cytosol pourrait servir de récepteur à un monomère de Bax soluble et ainsi induire l'activation et l'insertion de ce dernier. Ce mécanisme d'auto-activation peut-être inhibé par Bcl-2. De cette façon tant que Bcl-2 est capable de tamponner l'action de Bax, le système de prise en charge de Bax par son récepteur Tom22 et le complexe TOM constituerait le moyen de maintenir l'association de Bax avec la membrane externe mitochondriale jusqu'à ce que le ratio Bcl-2/Bax mitochondrial soit en faveur de Bax favorisant donc son mécanisme d'auto-activation. Cela permettrait de saturer le pouvoir anti-apoptotique du Bcl-2 mitochondrial et ensuite le phénomène d'auto-activation de Bax amplifierait l'association de Bax avec la mitochondrie et se traduirait par l'augmentation du niveau d'oligomérisation de Bax jusqu'à la formation d'un complexe de 400 kDa dont l'unité principale pourrait être du Bax dimérique. Cette oligomérisation croissante serait alors accompagnée en parallèle par l'augmentation progressive de la perméabilité mitochondriale.

Il faut noter également que ce modèle présente une forte homologie avec le mode d'action des toxines bactériennes formant des pores. En effet Bax possède un domaine de formation du pore et un domaine de reconnaissance d'une protéine membranaire. Suite à sa translocation il s'insère dans la membrane mitochondriale, s'oligomérise et induit la formation de pores. Dans ce modèle l'homologie avec le fonctionnement des toxines bactériennes est flagrante et Bax peut être ainsi apparenté à une

toxine endogène produite par la cellule elle-même. Ceci ferait donc du mécanisme apoptotique un système adopté par les cellules inspiré directement du mécanisme de toxicité bactérienne.

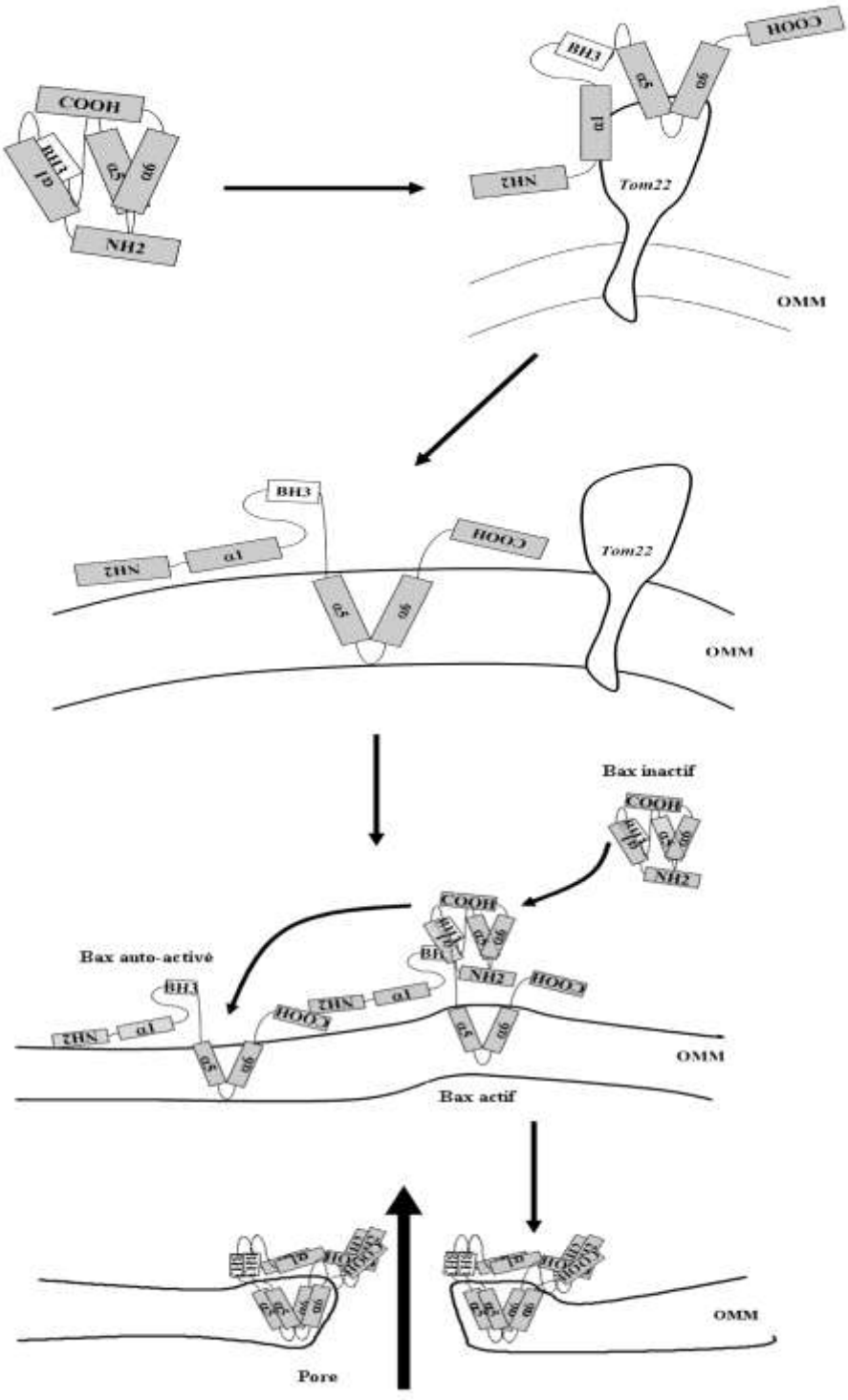


Figure 7: Modèle relatant le mode d'action de Bax. La forme soluble de Bax se relocalise à la mitochondrie via l'interaction avec Tom22. Bax s'insère ensuite dans la membrane externe avec l'aide possible du complexe TOM. Une fois Bax inséré, le mécanisme d'autoactivation rentre en jeu permettant l'amplification de l'oligomérisation de Bax. Les oligomères de Bax induisent alors la formation de pores membranaires.

Perméabilité mitochondriale au cours de l'apoptose

A. Avant-propos

Comme nous l'avons vu en introduction il existe plusieurs hypothèses concernant la perméabilisation mitochondriale induite par Bax au cours de l'apoptose. Parmi celles-ci il a été cité l'interaction directe de Bax avec des composants du PTP comme l'ANT (**Marzo *et al*., 1998**) ou encore la modulation de l'activité du VDAC par Bax via une interaction directe (**Shimizu *et al*., 2000**). A l'heure actuelle cependant, l'idée prédominante, comme nous l'avons vus, est que l'augmentation de la perméabilité mitochondriale est la conséquence de la formation de pores médiée par l'oligomérisation de Bax (**Antonsson *et al*., 2000**) (**Saito *et al*., 2000**). Cependant, jusqu'à ce point, l'ensemble de ces résultats n'était que le fruit d'observations de la perméabilisation induite par Bax dans un environnement membranaire artificiel. Ce n'est que récemment que l'observation fut faite d'une activité canal retrouvée dans des mitochondries apoptotiques et impliquée dans le mécanisme apoptotique et la perméabilisation mitochondriale subséquente.

En effet une étude électrophysiologique de membranes de mitochondries issues de cellules induites en apoptose a révélé l'apparition d'un canal de très haute conductance (**Pavlov *et al*., 2001**). Ce canal a été nommé MAC (**M**itochondrial **A**poptotic **C**hannel) et ses niveaux de conductance les plus élevés impliquent l'existence d'un pore de 4 nm de diamètre ce qui représente un diamètre suffisant pour permettre le passage du cytochrome c. En outre l'apparence de ce canal peut être prévenue par la surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Une étude complémentaire a permis de confirmer que le MAC possède la capacité de permettre le passage du cytochrome c (**Guo *et al*., 2004**). Ces résultats suggèrent donc que le MAC pourrait être le canal par lequel le cytochrome c serait libéré de la mitochondrie au cours de l'apoptose. L'étude suivante correspond à une étude du MAC dans un modèle *in vivo* de mitochondries de foie de rat dont les hépatocytes ont été massivement induits en apoptose.

B. Article : Le MAC correspond à un événement tardif au cours de l'apoptose

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY
Vol. 279, No. 45, Issue of November 5, pp. 46832–46840, 2004
Printed in U.S.A.
© 2004 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

The Mitochondrial Apoptosis-induced Channel (MAC) Corresponds to a Late Apoptotic Event*

Received for publication, May 10, 2004, and in revised form, July 23, 2004
Published, JBC Papers in Press, August 24, 2004, DOI 10.1074/jbc.M405183200

Gilles Guihard‡§, Gregory Bellot‡, Carole Moreau‡¶, Gilbert Pradal‖, Nicolas Ferry**, Raphael Thomy‡, Paulette Fichet‡, Khaled Meflah‡, and François Marie Vallette‡

*From ‡INSERM UMR 601, Département de Recherche en Cancérologie (DRC), Equipe Labellisée Ligue contre le cancer, 9 quai Moncousu, 44035 Nantes Cedex, France, the ‖UFR Médecine, 1 place A. Ricordeau, 44000 Nantes, France, and the **UFR Médecine CIC-INSERM 04, 1, place A. Ricordeau, 44093 Nantes Cedex, France*

We have investigated the mechanism responsible for mitochondria permeabilization occurring during cell apoptosis. We have developed an *in vivo* model of apoptotic rat liver. Mitochondria appeared as an homogeneous population in control liver. On the contrary, mitochondria varied in size, morphology, and the matricial density in apoptotic liver. Mitochondria were purified from control and apoptotic livers. In control conditions, a single mitochondrial population was identified; whereas three populations of mitochondria were purified from apoptotic liver. Our data show that these apoptotic populations correspond to early, intermediate, and late apoptotic mitochondria, which are characterized by an increasing extent of permeabilization of their outer membrane and a gradual enrichment in oligomerized Bax protein. Remarkably, a new ionic channel was observed in apoptotic but not in control mitochondria. The biophysical and pharmacological properties of this channel are in good agreement with those reported for a previously described mitochondrial apoptosis-induced channel (MAC) (Pavlov, E. V., Priault, M., Pietkiewicz, D., Cheng, E. H., Antonsson, B., Manon, S., Korsmeyer, S. J., Mannella, C. A., and Kinnally, K. W. (2001) *J. Cell Biol.* 155, 725–731). However, MAC activity was only observed in the late apoptotic mitochondrial population. Thus, our study establishes that MAC activity is related to the overall apoptotic process but corresponds to a late event.

Cell apoptosis is of primary importance in the control of organ and tissue development, as well as in cell organization and homeostasis (reviewed in Ref. 1). Defaults in the execution or regulation of the apoptotic program have been involved in proliferative as well as degenerative pathologies (reviewed in Ref. 2).

Apoptosis results from highly coordinated biochemical events (reviewed in Ref. 3), among which the recruitment of pro-apoptotic members of the Bcl-2 family, such as Bax or Bak at the mitochondria constitutes a major checkpoint conditioning the engagement of cell degradation (4). It is now well admitted that mitochondria undergo general permeabilization upon their interaction with Bax or Bak proteins (5). Following this, apoptogenic proteins of the mitochondrial intermembrane space are released into the cytosol, thus triggering the activation of caspase-dependent and caspase-independent degradation of the cell compounds. Interestingly, the release of pro-apoptotic mitochondrial factors occurs with different kinetics (6, 7) indicating that mitochondrial outer membrane (MOM)[1] permeabilization proceeds through kinetically and perhaps mechanistically distinct steps.

Despite the wealth of *in vitro* and *in vivo* investigations, the molecular mechanism responsible for Bax-dependent MOM permeabilization is still controversial and several, although non-exclusive, hypothetical models have been considered (8). In an early model, Bax has been described as an efficient activator of the mitochondrial permeability transition pore (PTP) (9, 10). Accordingly, Bax-induced PTP activation leads to an outer membrane rupture through mitochondrial swelling. Supporting this, modulators of PTP activity modulate Bax-induced mitochondrial permeabilization (reviewed in Ref. 11). Furthermore, Bax can promote new channel activity in artificial membrane bearing adenine nucleotide translocators (12) and can also modulate adenine nucleotide translocator channel activity (13). However, in several cases of Bax-mediated cell apoptosis, mitochondrial swelling is not observed and has been reported to be independent of a PTP activation (14–16). An alternative model has been developed in which Bax inserts MOM and forms a pore facilitating intermembrane space protein diffusion through MOM. This is supported by reports describing Bax-induced channel formation into planar lipid bilayer and liposomes (17–22), although Bax-induced pore permeability toward cytochrome *c* is not clearly demonstrated (23). In another hypothesis, Bax modifies resident MOM channels. Strengthening this, an increase in VDAC conduction properties has been reported upon its interaction with Bax (20, 24, 25). Recently, patch clamp investigations of MOM electrophysiological properties revealed a new channel (the so-called MAC for mitochondrial apoptosis-induced channel) in mitochondria purified from an apoptotic cell line and bax-expressing yeast were investigated (26). MAC corresponded to a large conductance, and cytochrome *c* interacting channel (26–28). Accordingly, MAC has been postulated to correspond to the channel responsible for cytochrome *c* efflux through MOM during cell apoptosis.

In the present work, we have investigated the relevance of

* This work was supported in part by INSERM and La Ligue Contre le Cancer. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "*advertisement*" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ To whom correspondence should be addressed: Dept. de Recherche en Cancérologie, INSERM U601, 9 quai Moncousu, 44035 Nantes, France. Tel.: 33-0-2-40-08-40-05; Fax: 33-0-2-40-08-40-62; E-mail : gilles.guihard@nantes.inserm.fr.

¶ Present address: INSERM EMI U-0022, Université Paris 7, 16 rue Henri Huchard, 75018 Paris, France.

[1] The abbreviations used are: MOM, mitochondrial outer membrane; PTP, permeability transition pore; VDAC, voltage-dependent anionic channel; LPS, lipopolysaccharide; D-galN, D-galactosamine; nS, nano-Siemens; P_o, channel open probability; MOPS, 4-morpholinepropanesulfonic acid.

This paper is available on line at http://www.jbc.org

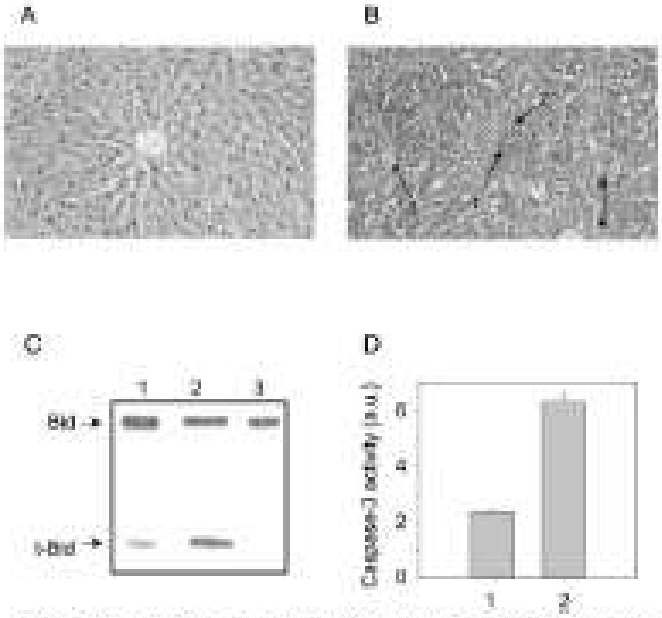


FIG. 1. Characterization of rat liver apoptosis. Histological characterization of rat livers. Animal LPS + D-galN treatment was performed as described under "Experimental Procedures." 5-μm sections were realized on fixed livers obtained from sham-treated (*A*) and treated (*B*) rats, and were stained using the hematoxylin-ploxin procedure. *1*, hemorrhagic area; *2*, fragmented nucleus; *3*, vacuolized cell; *4*, apoptotic bodies. Cytosolic Bid proteolysis is illustrated in *C*. Cytosolic fractions were obtained from sham-treated (*lane 1*) or treated (*lane 2*) animals. 5 μg of recombinant full-length Bid (human isoform) was loaded in the *lane 3*. Bid detection was performed using a Bid antibody as described under "Experimental Procedures." *D*, caspase-3 activity (expressed in arbitrary units (a.u.)) was measured in cytosolic extracts obtained from sham-treated (*lane 1*) and treated (*lane 2*) rats. Data correspond to the mean ± S.E. of quintuplet measurements realized on three sham-treated and three treated rats.

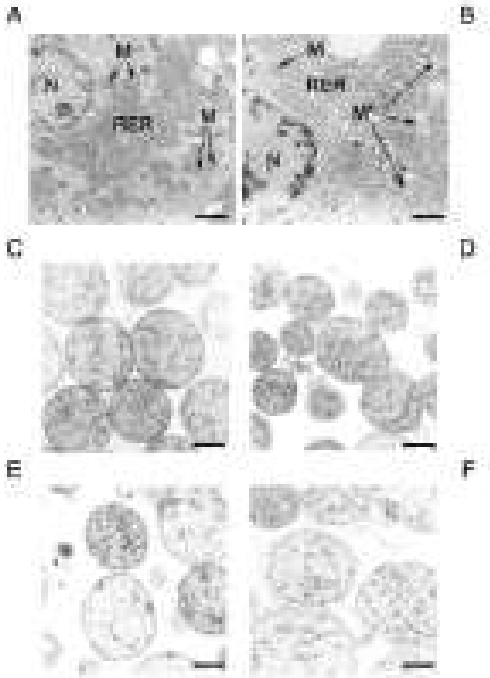


FIG. 2. Ultrastructural analysis. Electron micrographs of liver ultrathin sections are illustrated in *A* and *B* and correspond to sham-treated and treated rats, respectively. Mitochondria (*M*), nucleus (*N*), and rough endoplasmic reticulum (*RER*) are indicated. In *B*, note the condensed nuclear chromatin, the general disorganization of RER, and the mitochondrial pleomorphism that is illustrated by normally sized mitochondria (*M*) and swollen mitochondria (*M**). RCM, HAM, LAM1, and LAM2 ultrastructures are shown in *C*, *D*, *E*, and *F*, respectively. *Horizontal scale bars* correspond to 2 μm (*A* and *B*) and 0.5 μm (*C–F*).

MAC in a more physiological model of apoptosis induced in rat liver. Our results show that *in vivo* MAC is a functional component of the envelope of apoptotic mitochondria, the biophysical and pharmacological properties of which are established here for the first time. However, because MAC is specifically observed in late apoptotic mitochondria, we propose that MAC does not correspond to the structure responsible for the early mitochondrial permeabilization observed in cell apoptosis.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals and Chemicals—*Escherichia coli* LPS serotype 0127:B8, D-galN, apo-cytochrome *c*, cytochrome *c*, lysozyme, cyclosporin A, and atractyloside were from Sigma. All salts and buffers used here were analytical grade.

In Vivo Liver Apoptosis—200–250 g of RD IX rats received an intraperitoneal injection of LPS (50 mg kg^{-1} body weight) and D-galN (1 g kg^{-1} body weight) solubilized in sterile NaCl (treated rats) or an injection of sterile NaCl (0.9%, w/v) only (sham-treated rats). 5 h and 30 min after the beginning of the treatment, sham-treated and treated rats were euthanized by a lethal injection of ketamine (10 mg/ml) and xylazine (0.6% w/v). Animals were starved from diet but provided with fresh water within the 6 h preceding their euthanasia.

Biochemistry—Purification of liver mitochondria was performed at 4 °C as described earlier (29). In brief, liver was harvested immediately after animal euthanasia and was homogenized with 5 volumes of an extraction buffer containing 250 mM sucrose, 5 mM Hepes-K, pH 7.0, in an Elvehjem motor driven Teflon pestle (20 strokes, 1,000 rpm). Liver homogenate was cleared from cell debris and nuclei by a 1,200 × *g* centrifugation (20 min) and the crude mitochondrial fraction was pelleted by a 8,700 × *g* centrifugation (15 min). After two washes by 300 mM mannitol, 10 mM MOPS (pH 7.0), crude mitochondrial fraction was layered onto the top of a discontinuous Percoll™ gradient prepared in 300 mM mannitol, 10 mM MOPS (pH 7.0) and consisting of 2 ml of Percoll™ 70%, 3 ml Percoll™ 30%, 2 ml of Percoll™ 18%, and 2 ml of Percoll™ 10%. Gradients were centrifuged (30,000 × *g*, 45 min), and the different mitochondrial fractions were collected at the different Percoll™ interfaces. Mitochondria were washed twice with 300 mM mannitol, 10 MOPS (pH 7.0) and were kept at −80 °C after their freezing in liquid N_2. The liver cytosolic fraction was obtained from liver homogenate cleared from intracellular membranes by centrifugation (100,000 × *g*, 30 min). Proteins into the different samples were determined using bovine serum albumin as a standard.

DEVDase activity was measured on liver cytosolic fractions originating from sham-treated and treated rats, using the fluorogenic caspase-3-specific substrate (Ac-DEVD-AMC, Promega), added in the presence of Triton X-100 (0.01%, v/v) (29). The assay consisted in a quintuplet measurement of DEVDase activity performed for 3 sham-treated and 3 treated rats. The data corresponded to the mean ± S.E. of the results and were expressed in arbitrary units.

For Western blots experiments, cytosolic or mitochondrial proteins (50 μg) were separated by SDS-PAGE using a 12% acrylamide/bisacrylamide running gel. Polyvinylidene difluoride membranes (Immobilon-P, Millipore, Billerica, MA) were used for protein transfer (15 V, 15–30 min). Antibodies directed against Bax (isotype 2D2, 1/200, Santa Cruz Biotechnology, San Diego, CA), Bid (1/1000, BD Transduction Laboratories, Lexington, KY), F1-ATPase β-subunit (1/1000, Molecular Probes, Eugene, OR), cytochrome *c* (1/1000, RD Systems, Minneapolis, MN), and SmacDiablo (1/500, ProSci Inc., Poway, CA) were used for immunoblot analysis. Horseradish peroxidase-coupled secondary antibodies (1/2000) and the ECL-revelation kit (Amersham Biosciences) were used for protein detection. Signal was quantified using IP Lab gel software (Signal Analytics, Vienna, VA).

Cross-linking experiments were realized using the homo-bifunctional reagent disuccinimidyl suberate according the manufacturer's procedure (Pierce). Briefly, mitochondria (50 μg of protein) were incubated (2 h, 4 °C) in 150 mM NaCl, 20 mM NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 (pH 7.5) in the presence of disuccinimidyl suberate (1 mM). The reaction was blocked by the addition of 1 M Tris (pH 7.5) (10 mM final concentration), and proteins (50 μg) were analyzed by SDS-PAGE (10% acrylamide/bisacrylamide running gel) and immunoblotting using anti-Bax 2D2 antibody (1/200).

Microscopy—Fresh livers were rinsed in phosphate-buffered saline (PBS) at 4 °C. They were then fixed in phosphate-buffered saline + paraformaldehyde (4% w/v, 4 °C, overnight) and further incubated

TABLE I
Properties of the mitochondrial populations

Proteins from HCM, HAM, LAM1, and LAM2 populations were determined and were expressed as a percentage ± S.E. of the crude mitochondrial fraction layered onto the density gradient. Numbers in parentheses refer to the number of independent experiments used for calculations. The apparent density of the mitochondrial populations corresponded to the density of the Percoll layers calculated as described by the manufacturer. The diameter of mitochondria was measured on electron micrographs. The results are expressed as mean ± S.E. The number in parentheses corresponds to the number of mitochondria used for calculation.

	Crude fraction	Apparent density	Mean diameter
	%	$g \cdot ml^{-1}$	$\mu m \pm S.E.$
HCM	83.2 ± 4.8 ($n = 7$)	$1.051 < d < 1.096$	0.91 ± 0.18 ($n = 450$)
HAM	66.5 ± 5.0 ($n = 7$)	$1.051 < d < 1.096$	0.92 ± 0.26 ($n = 450$)
LAM1	16.3 ± 3.4 ($n = 7$)	$1.037 < d < 1.051$	ND*
LAM2	10.2 ± 4.6 ($n = 7$)	$1.028 < d < 1.037$	1.50 ± 0.24 ($n = 450$)

* ND, not determined.

during 24 h at room temperature. After embedding in paraffin, tissue was cut in 5-μm sections. Sections were stained with hematoxylin-phloxin and observed with a conventional visible light microscope (Olympus BH2).

For electronic microscopy, liver samples from control and treated rats were fixed in sodium cacodylate (100 mM, pH 7.2) containing 2% (w/v) OsO_4, rinsed by 200 mM sodium cacodylate (pH 7.2) and 64.5 mM NaCl, then dehydrated with ethanol at increasing grades. Samples were washed by propylene oxide before their inclusion in Epon 812. Ultrathin slices were stained by uranyl acetate and lead citrate. Observations were performed onto a TEM JEM 1010 (Philips).

Electrophysiology—Mitochondrial membranes were harvested (100,000 × *g*, 30 min) from mitochondria submitted to an osmotic down-shock in 10 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 (pH 7.0). Giant proteoliposomes were formed as described earlier (30) by mixing 10–50 μg of mitochondrial membrane proteins with 1 mg of azolectine (soybean type IV, Sigma). The mixture was frozen (liquid N_2) and thawed (room temperature) 3 times and 10-μl aliquots were spotted onto a 96-well plate. Samples were dehydrated under vacuum at room temperature (3 h) and rehydrated overnight (4 °C) in the presence of 150 mM KCl, 20 mM $MgCl_2$, 10 mM Hepes-K (pH 7.0). The proteoliposomes formed in these conditions were layered onto a 35-mm Petri dish containing 50 mM KCl, 10 mM Hepes-K (pH 7.0).

Single channel experiments were conducted using 20–25 MΩ patch clamp pipettes filled with 150 mM KCl, 10 mM Hepes-K (pH 7.0). After sealing, the proteoliposome membrane was excised and rapidly air/water interfaced to prevent further membrane vesiculorization. The membrane patch was superfused using an homemade local perfusion system containing different media. Single channel currents were monitored using the voltage-clamp configuration of the patch clamp technique. Applied voltage (V_m) corresponded to ($V_{pip} - V_{bath}$) with V_{bath} virtually grounded to 0 mV. Currents were amplified using an Axopatch 200B apparatus (Axon Instruments, Union City, CA) and digitized using a Labmaster A/D converter (Scientific Solution). Current traces were stored on a digital audio tape DTR 1202 (Bio-Logic, Port de Claix, France), then played back with a low-pass filter frequency between 1.2 and 2.5 kHz (Burr-Stroud EF5–2.0 filter). Sampling frequency adjustment (between 4 and 7.5 kHz) and current analysis were performed by using pClamp 9.0 software (Axon Instruments).

Single channel conductance (γ) was calculated from the current-voltage (I/V) relationship. Theoretical diameter of the pore (Ø) was deduced from the following equation,

$$Ø \text{ (in nm)} = 2\,(\gamma\rho \cdot 1/\Pi)^{0.5} \qquad \text{(Eq. 1)}$$

where γ is the channel conductance (in S), ρ is the resistivity of the solution (~0.8 Ω.m), and l is the minimal length of the pore (7×10^{-9} m), which corresponds to the membrane width. Ion channel selectivity was deduced from the current reverse potential value (E_{rev}) introduced into the Goldman-Hodgkin-Katz equation. Channel open probability (P_o) was measured on current traces lasting at least 1 min.

Data Analysis—Images were generated from scanned pictures using an Epson 2120 photo dalums scanner (1200 dpi resolution) and Photoshop 6.0 (Adobe) software. Numerical and statistical data were analyzed using Sigma-Plot and Sigma-Stat (Jandel Scientific) software.

RESULTS

In Vivo LPS and D-galN Treatment Induces Liver Apoptosis That Is Related to the Mitochondrial Pathway—In mouse, the intraperitoneal injection of LPS and D-galN has been shown to promote fulminant hepatitis through the recruitment of the

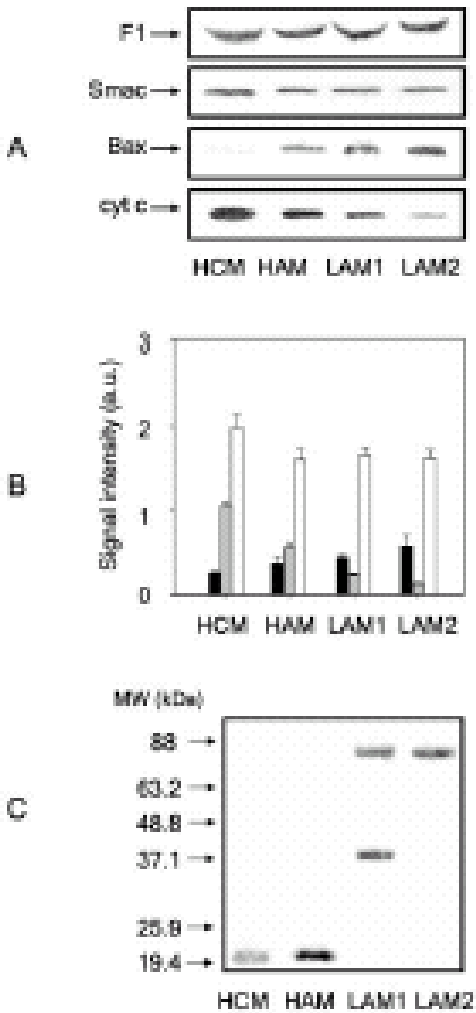


FIG. 3. Immunoblot analysis of control and apoptotic mitochondrial fractions. Proteins from HCM, HAM, LAM1, and LAM2 were separated by SDS-PAGE and the contents is Bax, cytochrome *c* (*cyt c*), Smac/Diablo (*Smac*), and β-subunit of F1-ATPase (*F1*) were analyzed by Western blots (*A*). A quantification of the protein content in the different populations is illustrated in *B*. The signals corresponding to the different proteins bands were normalized by that of F1-ATPase β-subunit. *Black*, *gray*, and *white bars* correspond to Bax, cytochrome *c*, and Smac/Diablo normalized contents, respectively. The values correspond to the mean ± S.E. of three independent experiments. The differences between control and each apoptotic fraction was found significant (*t* test: $p < 0.05$). *C*, HCM, HAM, LAM1, and LAM2 populations were incubated with disuccinimidyl suberate as described under "Experimental Procedures" and the proteins were separated by SDS-PAGE. Bax protein was detected in the different fractions using the 3-21 antibody. The position of the molecular weight markers are indicated on the *left*. The figure is representative of three independent experiments performed after 3 purifications of control and apoptotic mitochondria.

tumor necrosis factor-α/tumor necrosis factor receptor pathway, Bid protein proteolytic activation, Bax protein targeting to mitochondria, and the subsequent release of cytochrome *c* (31, 32). In the present study, we have verified that rat liver developed a massive apoptosis upon LPS + D-galN treatment. Liver parenchymal organization exhibited strong histological alterations with large foci of inflammation (Fig. 1, *A* and *B*) upon the treatment by LPS + D-galN. Vacuolized cells as well as cells with fragmented nuclei could be identified and numerous apoptotic bodies were also observed in these conditions (Fig. 1, *A* and *B*). The cleavage of the pro-apoptotic protein Bid was clearly observed in liver cytosol originating from treated rats (Fig. 1*C*). The Bid/t-Bid ratio decreased in treated rats (1.56 ± 0.26, $n = 3$) when compared with that of sham-treated rats (4.5 ± 0.52, $n = 3$). Finally, a ~3 times enhancement of caspase-3 activity was observed in the cytosolic fraction of treated rats when compared with that of sham-treated ones (Fig. 1*D*). Taken as a whole, our data show that rat liver underwent a general mitochondrial apoptosis upon LPS + D-galN treatment, thus, establishing for the first time a rat model of liver cell apoptosis.

Different Mitochondrial Populations Are Produced during in Vivo Liver Apoptosis—The ultrastructure of control and apoptotic livers was examined (Fig. 2, *A* and *B*). Control hepatocytes contained homogenous mitochondria regarding their size, morphology, and matricial electronic density (Fig. 2*A*). On the contrary, a large mitochondrial pleomorphism could be seen in apoptotic hepatocytes (Fig. 2*B*). We identified a co-existence of normally sized mitochondria with undamaged envelope and numerous inner membrane cristæ with swollen mitochondria exhibiting no inner membrane crest and an empty matrix (Fig. 2*B*).

Mitochondria were purified through density gradient. Control mitochondria resulted in a single population (the so-called HCM for heavy control mitochondria), at the 1.051/1.095 g/ml density interface (Table I). It represented 83.2 ± 4.8% of the crude fraction, the remaining material being dispersed into the gradient. Apoptotic mitochondria were separated in three populations, namely HAM for heavy apoptotic mitochondria, LAM1 for light apoptotic mitochondria fraction 1, and LAM2 for light apoptotic mitochondria fraction 2 (Table I). HAM density corresponded to that of the HCM fraction, whereas LAM1 and LAM2 fractions exhibited lower densities (Table I). HAM, LAM1, and LAM2 fractions accounted for 66.5 ± 5.0, 16.3 ± 3.4, and 10.2 ± 4.6% of the crude apoptotic mitochondrial fraction, respectively (Table I). The purification procedure did not generate a physical alteration of HCM and HAM fractions, because their re-loading onto the density gradient resulted in the recovery of a single population located at the 1.051/1.095 g/ml density interface (data not shown).

HCM, HAM, LAM1, and LAM2 corresponded to the entire mitochondria delimited by a double membrane envelope (Fig. 2, *C–F*). HCM and HAM exhibited conventional crest-forming inner membranes and a dense matrix (Figs. 2, *C* and *D*). These mitochondria did not differ in size because of similar mean diameter values (Table I). LAM1 were complex with different sizes, with different outer and inner membranes patterns, and with different matrix electronic densities (Fig. 2*E*). LAM2 corresponded to a swollen population (Fig. 2*F*). The mean diameter of LAM2 was 1.5 ± 0.24 μm (Table I). We observed a drastic reduction of the LAM2 matricial content (Fig. 2*D*) when compared with those of HCM and HAM (Fig. 2, *C* and *D*). Ruptures of the outer membrane were detected in the majority of LAM2 mitochondria (Fig. 2*F*).

Biochemical characterization of the different mitochondrial populations was realized (Fig. 3). In agreement with previous data (33), we have observed a weak but significant association of Bax with control mitochondria (Fig. 3*A*). Bax was also present in apoptotic mitochondria (Fig. 3*A*). Using the F1-ATPase β subunit as an internal standard (Fig. 3*A*) (33), the amount of Bax was quantified (Fig. 3*B*). Our results show an enrichment of Bax protein in apoptotic mitochondria when compared with that observed in control mitochondria (Fig. 3*B*). Because Bax oligomerization has been shown to be involved in Bax-induced mitochondrial permeabilization (33–35), cross-linking experiments were realized on the different populations of mitochondria purified from control and apoptotic livers. Our results show that Bax was mainly present as a monomer in the HAM population (Fig. 3*C*), whereas most of Bax protein associated with LAM2 was recovered in a ~80-kDa oligomer (Fig. 3*C*). The oligomerization state of Bax associated with LAM1*A* was complex, we detected Bax in two oligomers of ~40 and ~80 kDa.

Bax insertion and oligomerization were paralleled with MOM permeabilization, because apoptotic mitochondria exhibited cytochrome *c* and Smac/Diablo contents lower than those found in control (Fig. 3, *A* and *B*). Interestingly, we observed a progressive reduction in the cytochrome *c* content of the different apoptotic populations. Indeed, cytochrome *c* in HAM, LAM1, and LAM2 corresponded to ~48, ~25, and ~10% of that found in the HCM population. Thus, our data established a direct correlation between the amount and the oligomerization state of mitochondrial Bax and the extent of mitochondrial permeabilization in our conditions. Taken as a whole, these data strongly indicate that HAM, LAM1, and LAM2 populations represent different chronological steps of Bax-related MOM permeabilization that was generated *in vivo*.

Electrophysiological Analysis of Mitochondrial Populations—We have investigated the electrophysiological properties of the different populations of apoptotic mitochondria and compared them to those of control mitochondria. Because the LAM1 population composition appeared heterogenous on electron micrographs, we focused our study on HCM, HAM, and LAM2. A voltage-dependent anionic channel (VDAC) was observed in 28.6, 29.9, and 28.1% of the cases for HCM, HAM, and LAM2, respectively (Table II). These values were not statistically different. VDAC biophysical properties are given in Fig. 4. VDACs of HCM, HAM, and LAM2 displayed similar long-lasting transitions from open state to low conductance substates (Fig. 4*A*). The number of subconducting states increased as the membrane became more polarized (Fig. 4*A*). This was observed at both positive and negative membrane potentials (Fig. 4*A*). From IV_m curves established in symmetrical (150/150 mM KCl) and asymmetrical (150/50 mM KCl) conditions (Fig. 4*B*), we calculated $\gamma_{open} = 702 \pm 18$ pS ($n = 16$) and $\gamma_{sub1/2} = 653 \pm 41$ pS ($n = 28$), $\gamma_{sub1/2} = 594 \pm 23$ pS ($n = 18$) and $\gamma_{sub1/2} = 538 \pm 27$ pS ($n = 26$), $\gamma_{sub3/4} = 478 \pm 35$ pS ($n = 25$) and $\gamma_{sub3/4} = 448 \pm 38$ pS ($n = 20$), for HCM, HAM, and LAM2, respectively. Furthermore, we determined $P_{Cl}/P_K = 1.97$, $P_{Cl}/P_K = 2.02$, and $P_{Cl}/P_K = 2.31$ for HCM, HAM, and

TABLE II
Mitochondrial ion channels

The number of VDAC, PTP, and MAC channels was determined after the reconstitution into giant liposomes of mitochondrial membrane protein originating from HCM, HAM, and LAM2 populations. Number in parentheses corresponded to gigaohm seals taken into considerations.

Number of observations	HCM ($n = 98$)	HAM ($n = 87$)	LAM2 ($n = 103$)
VDAC	28	26	29
PTP*	3	3	2
MAC	0	0	18

* PTP was observed after adding 2 mM $CaCl_2$ in the superfusion medium.

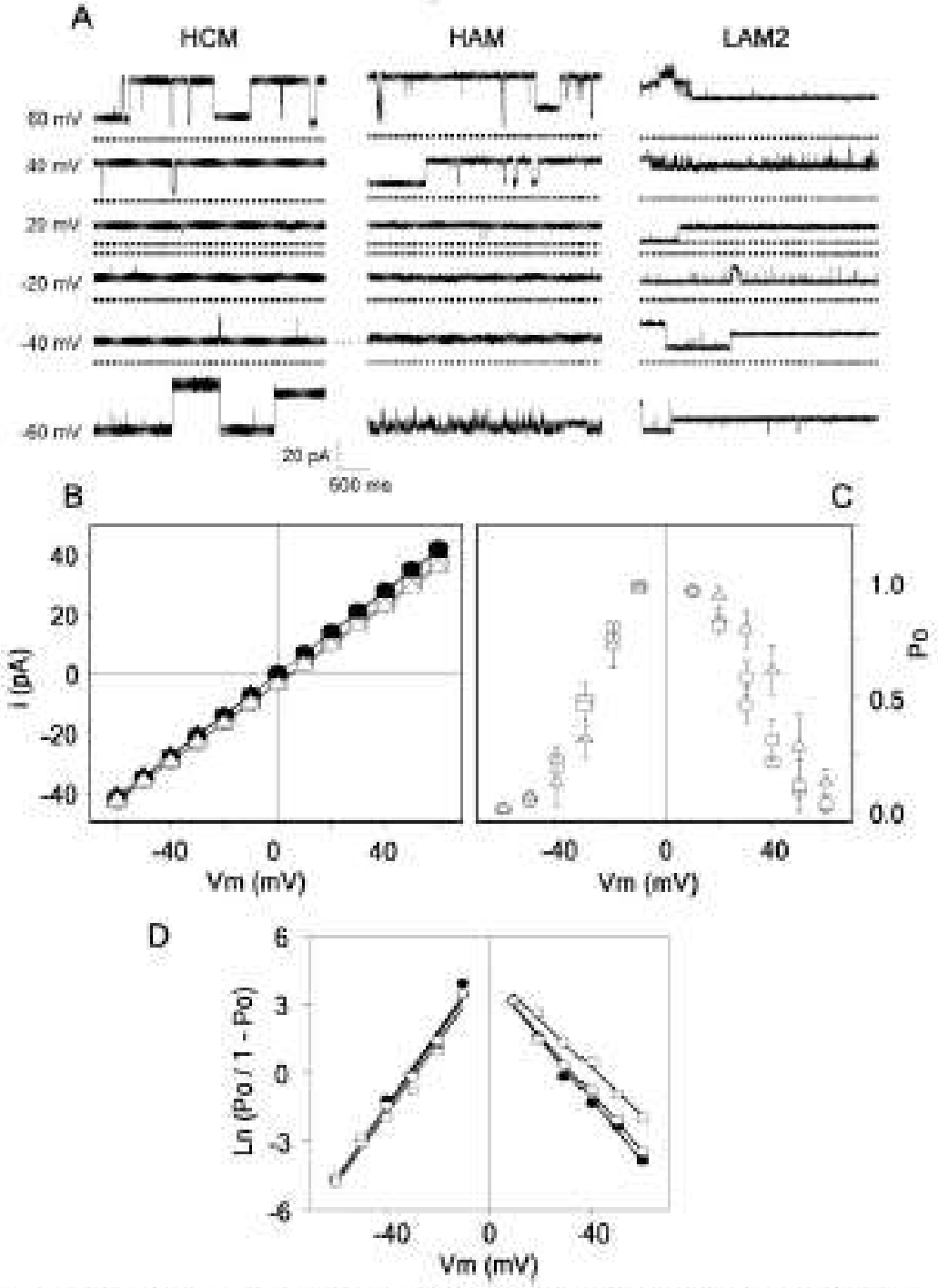


FIG. 4. Electrophysiological properties of the voltage-dependent anionic channel. Giant proteoliposomes were formed and patch clamp experiments were conducted as indicated under "Experimental Procedures." *A*, single channel recordings at various membrane potentials in symmetrical (150/150 mM KCl) conditions. Current baselines are indicated by *horizontal arrows*. *B*, VDAC current-voltage relationships obtained after the reconstitution of HCM (*circles*), HAM (*squares*), and LAM2 (*triangles*) membrane proteins. *Closed* and *open symbols* correspond to data obtained in symmetrical (150/150 mM KCl) and asymmetrical (150/50 mM KCl) conditions, respectively. Each point corresponds to the mean ± S.E. of 16 to 20 independent VDACs (see text). *Straight lines* correspond to linear fits of the data ($r^2 > 0.99$). *C*, VDAC open probability (P_o) was determined at various membrane potentials under symmetrical (150/150 mM KCl) conditions, and was plotted against V_m. *Circles*, *squares*, and *triangles* correspond to VDAC originating from HCM, HAM, and LAM2 populations, respectively. Data correspond to the mean ± S.E. of five to nine independent measures. *D*, VDAC voltage-dependent parameters were determined as indicated in Table III. *Straight lines* correspond to linear fits of the data ($r^2 > 0.98$).

LAM2, respectively (Fig. 4*B*). P_o/V_m curves displayed typical bell-shaped relationships (Fig. 4*C*) and the parameters of the voltage dependence are given in Table III. VDAC gating charges were found to be similar for control and apoptotic mitochondrial populations in both positive and negative potential ranges. Calculation of $V_{o.5}$ show no differences between control and apoptotic populations (Table III), although we observed a +10 mV right-shift for LAM2 VDAC in the positive potential range when compared with VDAC found in HCM and HAM populations. Finally, VDAC activation energy values were found to be similar when control and apoptotic mitochondria were considered (Table III).

TABLE III
VDAC biophysical parameters

Biophysical parameters of VDAC voltage gating were determined from Fig. 4*D* and considering that $\ln[P_o/(1-P_o)] = -zF(V_m - V_{0.5})/RT$ (67), where z corresponds to the number of gating charges and $V_{0.5}$ represents the applied potential required for half-maximal P_o. Consequently, the activation energy corresponded to $-zFV_{0.5}$.

	$V_{0.5}$ (mV)		Gating charge		Activation energy (kJ·mol^{-1})	
	$V_m < -30$	$+10 < V_m$	$V_m < -30$	$+10 < V_m$	$V_m < -30$	$+10 < V_m$
HCM	−31.0	+31.4	4.1	3.8	12.2	10.6
HAM	−30.8	+29.8	4.0	3.8	11.7	10.5
LAM2	−28.7	+42.0	3.9	2.7	10.8	10.9

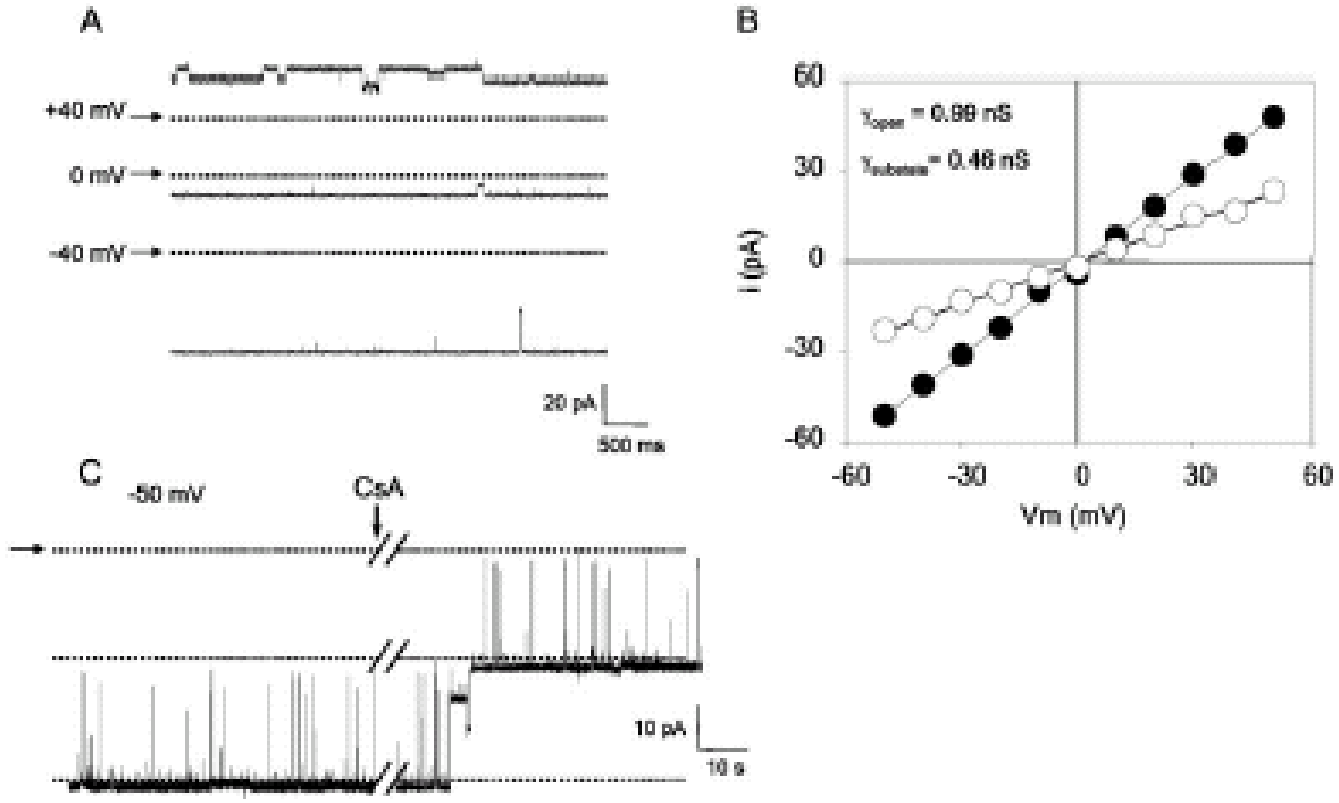


FIG. 5. PTP single channel activity. *A*, single channel activity was recorded at various membrane potentials in symmetrical (150/150 mM KCl) conditions. $CaCl_2$ (2 mM) was added to the superfusion medium. Current baselines are indicated by *horizontal arrows*. *B*, PTP current-voltage relationship. *Closed* and *open circles* correspond to current amplitudes of the full-conducting and of the main subconducting states, respectively. *Straight lines* correspond to the linear fits of the experimental data ($r^2 > 0.98$). *C*, cyclosporin A (CsA) (1 μM) induces PTP channel closure. Current baseline is indicated by the *horizontal arrow*.

A larger conductance (~1 nS) channel could also be recorded in both control and apoptotic mitochondrial populations in the presence of 2 mM Ca^{2+}. Current recordings exhibited transitions from closed to open states with a major substate located at ~50% of the full open state (Fig. 5*A*). Channel conductances were found to be 0.97 ± 0.16 (n = 3), 1.02 ± 0.094 (n = 3), and 0.94 ± 0.142 nS (n = 2) for HCM, HAM, and LAM2, respectively. Such a channel was inhibited by cyclosporin A (Fig. 5*C*). These properties are in agreement with those of the PTP channel (36, 37).

A new ion channel was specifically observed in LAM2 (Table II). In reference to that reported previously (26–28), we considered it as a MAC for mitochondrial apoptosis-induced channel. MAC accounted for 17.6% of the channels recorded for LAM2 (Table II). MAC-related activity was never detected in HCM or HAM although the number of giga-ohm seals tested for HCM, HAM, and LAM2 was similar (Table II). MAC induced large currents at any of applied potentials (Fig. 6*A*). As membranes became more electrically polarized, the current flow through MAC rapidly decreased, although not to zero, indicating that channel conductance substates were favored as the membrane voltage increases. The current-voltage relationship was found to be linear between −60 and +60 mV (Fig. 6*B*). We determined γ = 3.05 ± 0.65 nS (n = 12) and γ = 2.76 ± 0.44 nS (n = 18), in symmetrical (150/150 mM KCl) and in asymmetrical (150/50 mM KCl) conditions, respectively. Rarely did we observed larger conductance levels (γ = 5 nS, n = 2, and γ = 7 nS, n = 1). From the E_{rev} measurement (Fig. 6*B*), we determined a P_{Cl}/P_K = 1.68 ± 0.46, indicating that MAC poorly discriminated between K^+ and Cl^-. MAC was clearly voltage-dependent with a bell-shaped P_o-voltage relationship (Fig. 6*C*). Voltage-gating parameters are given in Table IV. Voltage dependence was almost symmetrical for positive and negative membrane potentials and the number of gating charges found to modulate the MAC opening was close to 6 (Table IV).

Pharmacological regulation of MAC was assayed (Fig. 7). The channel was neither sensitive to atractyloside (100 μM, n = 3), nor to cyclosporine A (1 μM, n = 5). Millimolar concentrations of Ca^{2+} did not modify MAC electrophysiological properties (not shown). On the contrary, cytochrome *c* stabilized the channel (6 cases over 10 trials) in a very low conducting substate (Fig. 7), which reflects a block of MAC by cytochrome *c*.

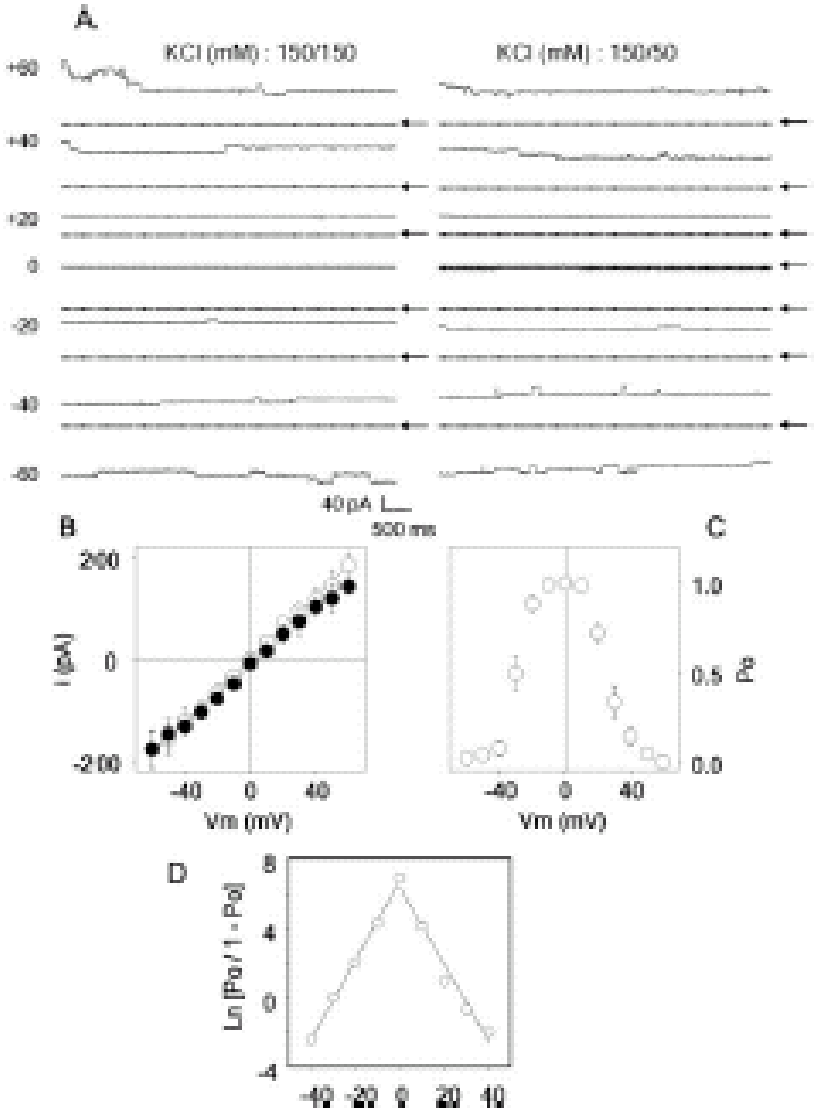


FIG. 6. Electrophysiological characterization of MAC. *A*, single channel recordings at various membrane potentials in symmetrical (150/150 mM KCl) and asymmetrical (150/50 mM KCl) conditions after the reconstitution of LAM2 membrane proteins into giant proteoliposomes. Current baselines are indicated by *horizontal arrows*. *B*, MAC current-voltage relationship. *Closed* and *open symbols* correspond to the current amplitudes measured in symmetrical and asymmetrical KCl conditions, respectively. Data correspond to the mean ± S.E. of 12 (symmetrical) and 18 (asymmetrical) independent observations. *Straight lines* correspond to linear fits of the data ($r^2 > 0.99$). *C*, MAC voltage dependence was analyzed in asymmetrical conditions. Recordings lasting at least 1 min after the onset of the membrane potential were considered for calculations. The open probability (P_o) of the channel is referred to the full conducting state of MAC. Data correspond to the mean ± S.E. of eight independent recordings. *D*, MAC voltage dependence parameters were determined as described in the legend to Fig. 5. Data correspond to the mean of eight independent recordings. *Straight lines* correspond to a linear fits of the data ($r^2 > 0.98$).

This block was fully reversible, although long lasting periods of washing were necessary for an entire recovery of MAC activity. Finally, we did not observe any modification in MAC activity in the presence of apocytochrome *c* ($n = 4$) or lysozyme ($n = 5$) (Fig. 7).

DISCUSSION

A Mitochondrial Heterogeneity Occurs After an in Vivo Induction of Liver Apoptosis—The *in vitro* incubation of purified mouse liver mitochondria with the pro-apoptotic protein Bid promotes a time-dependent alteration of the mitochondrial ultrastructure, which results in the segregation of different mitochondrial morphological classes (38). Similar observations have been made in other *in vitro* models of apoptosis (reviewed in Ref. 39).

In the present study, we establish for the first time that an *in vivo* induction of rat liver apoptosis promotes a mitochondrial pleomorphism. Mitochondrial populations described here share similar properties with those described *in vitro* (38). HCM corresponds to class I mitochondria with intact inner and outer membranes, a dense matrix, and a high content in periplasmic proteins. HAM is related to early apoptotic mitochondria with a permeabilized MOM, whereas HAM morphology is identical to that of the HCM. LAM2 strongly resembles late apoptotic mitochondria, with swollen morphology, a highly permeabilized envelope, and an empty matrix. LAM1 is heterogeneous, with normally sized and swollen mitochondria. LAM1 protein content is between HCM or HAM and LAM2. Thus, it is likely that LAM1 corresponds to an intermediate population of apoptotic mitochondria.

TABLE IV
MAC biophysical properties

Biophysical parameters of MAC voltage gating were deduced from Fig. 6*D* and according to the calculation depicted in Table III.

	$-40 \text{ mV} < V_m$	$V_m < 40$ mV
$V_{0.5}$ (mV)	−29.5	+26.5
Gating charges	5.9	5.7
Activation energy (kJ·mol^{-1})	16.8	15.7

MAC Properties—In apoptotic cultured cells and Bax-expressing yeast, MAC defines a slightly cationic 2-nS conductance channel (26, 27). We have used conditions for channel recordings identical to those described in these studies. Our data confirm MAC as an active mitochondrial channel. Furthermore, our study establishes that MAC observation is not restricted to *in vitro* models of cell apoptosis but is also present in mitochondria after induction of apoptosis *in vivo*.

MAC properties are unique and unrelated to those of other MOM resident channels. Indeed, the biophysical parameters calculated for MAC (this study), VDAC (this study and Refs. 40 and 41), and for the protein-conducting TOM channel (42)

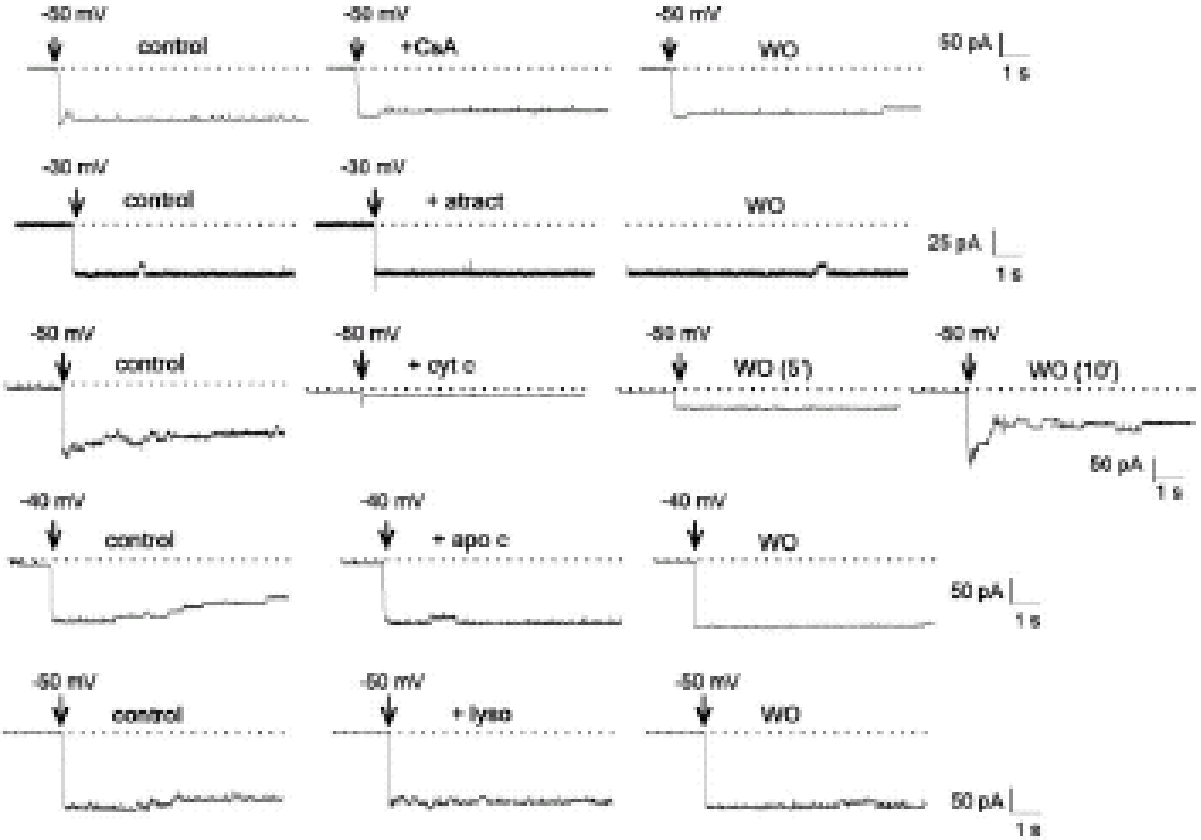


FIG. 7. MAC pharmacological properties. Single MAC activity was recorded in asymmetrical (150/50 mM KCl) conditions. Membrane potential was held from 0 mV to the value indicated in the figure under control conditions after the channel superfusion (during 3 to 7 min) by 1 μM cyclosporine A (*CsA*), 100 μM atractyloside (*Atract*), 5 μM cytochrome *c* (*cyt c*), 5 μM apocytochrome *c* (*apo*), or 5 μM lysozyme (*lyso*). The channel was then rinsed (*WO*) and tested at different membrane potentials. In the case of cytochrome *c*, longer periods of wash out were necessary for a complete recovery of MAC current. Current baselines are figured by the *dashed line*.

differ from one channel to another. PTP has been reported to participate in mitochondrial permeabilization through functional interactions of Bax with the adenine nucleotide translocator (9, 12, 13). Although, we have no direct evidence that PTP is not in part or totally responsible for MAC activity, we show that MAC is pharmacologically distinct from PTP, because modulators of PTP channel activity have no effect on MAC. *In vitro* Bax incubation with immunopurified VDAC induces a large conductance channel (*i.e.* 2.3 nS) (20), which is unlikely to be related to MAC because the Bax-VDAC channel is voltage independent and cytochrome *c*-insensitive, even in the presence of millimolar concentrations of cytochrome *c* (20). Moreover, Rostovtseva *et al.* (43) have characterized an absence of functional interaction between Bax and native VDAC. Finally, if MAC results from a Bax-VDAC interaction in our conditions, then a decrease of VDAC frequency of observation, between control and apoptotic mitochondria, is expected. Our study shows that this is not the case.

MAC conductance is close to 3 nS. To our knowledge, this defines the largest channel so far identified in living animal cells. Assuming that the conduction domain of MAC corresponds to a 7-nm length cylinder, one can deduce a pore diameter of 4.6 nm. This value is consistent with the diffusion of cytochrome *c*, a roughly spherical protein whose diameter is close to 3.0–3.5 nm (44). Mitochondrial peptide-sensitive channels and SEC 61 (two protein-conducting channels) display strong blocks of channel conductance when exposed to their respective substrates (*i.e.* mitochondrial or endoplasmic reticulum pre-proteins) (45–47), indicating that the transported protein plugs the channel. We show that a block of conductance is observed when MAC is superfused in the presence of cytochrome *c*. Thus, our data strongly suggest that cytochrome *c* inserts into the MAC channel. Finally, because apo-cytochrome *c* or lysozyme, which exhibit isoelectric point close to that of cytochrome *c*, have no effect on MAC activity, we propose that MAC/cytochrome *c* interactions result from structural, rather than purely electrostatic, determinants. MAC is voltage-gated. This contradicts the initial MAC characterization (26) but is supported by a later report (27). The existence of an electrical potential across the outer membrane is controversial (48). However, the opening of one or several MAC during mitochondrial permeabilization will certainly dissipate such membrane potential, thus promoting the channel in its full open conformation. MAC is a nonselective channel. Ion recognition by an ionic channel is based on electrical charges segregation by a region delineating a selectivity filter, as deduced from channel atomic structure (49). The estimated diameter of MAC is consistent with the diffusion of cytochrome *c*, the diameter of which largely exceeds those of Cl^- and K^+ ions (50). Thus, our observation that MAC is not selective is not surprising.

MAC Activity Correlates with Bax Oligomerization—Using physiological conditions for an *in vivo* induction of apoptosis, we have been able to detect Bax oligomers in apoptotic mitochondria. To our knowledge, this establishes the first correlation between the modification of Bax quaternary structure and the extent of permeabilization of apoptotic mitochondria *in vivo*. Very high molecular weight Bax oligomers have been observed in previous *in vitro* studies (33, 56). These are not detected in our conditions. This indicates that their association with mitochondria is lost during mitochondrial purification, or more likely that *in vivo* apoptosis triggers physiological amounts of Bax that are further addressed to the mitochon-

drial membranes, thus preventing its coalescence into large aggregates.

In our study, Bax oligomers increase in size from 20 to 40 kDa and finally to 80 kDa in early, intermediate, and late apoptotic mitochondria, indicating that Bax oligomerization is time-related and is likely to occur after Bax targeting to mitochondria. The different sizes of Bax oligomers formed *in vivo* are in good agreement with those formed in acellular conditions (33). Several studies have demonstrated the strong permeabilization potency of oligomerized Bax to permeabilize lipid bilayer (43, 51–52) as well as purified mitochondria (33, 53–56). In our study, MAC activity is observed in apoptotic mitochondria that exhibit Bax oligomers but not Bax monomers. Similarly, MAC is not observed when Bax is present as monomer. Thus, MAC activity can be correlated with Bax oligomerization in apoptotic mitochondria.

MAC Is a Late Apoptotic Channel—The contribution of MAC in MOM permeabilization can be questioned. Quantitatively, the value of MAC conductance determined in our study is in good agreement with a pore diameter large enough to allow cytochrome *c* diffusion. We show that MAC formed in our *in vivo* conditions can interact specifically with cytochrome *c*. These data would be consistent with an involvement of MAC in MOM permeabilization during cell apoptosis. However, MAC activity is never seen in the early permeabilized mitochondrial population. Thus, we conclude that MAC cannot be responsible for the early permeabilization of apoptotic mitochondria, and that MAC corresponds to a channel that contributes lately in the apoptotic process. Based on our results and on those published elsewhere (26–28), it is impossible for the moment to establish whether MAC results from a long time evolution of an initial permeabilizing structure, or whether MAC is the consequence of late feedback steps occurring at the mitochondrial level long after mitochondrial permeabilization. Further studies will be devoted to MAC structure/function relationships to understand MAC molecular origin and its contribution in the overall apoptotic process.

Acknowledgments—We are indebted to Professor D. Escande (INSERM U533, Nantes, France) for providing access to his patch clamp set-up. We thank Dr. P. Juin for the gift of Bid protein, M. Chédorge for technical assistance in electron microscopy, and Dr. M. Priault for helpful and stimulating discussions.

REFERENCES

1. Jacobson, M. D., Weil, M., and Raff, M. C. (1997) *Cell* 88, 347–354
2. Kroemer, G., and Reed, J. C. (2000) *Nat. Med.* 6, 513–519
3. Danial, N. N., and Korsmeyer, S. J. (2004) *Cell* 116, 205–219
4. Borner, C. (2004) *Biochim. Biophys. Acta* 1644, 71–72
5. Degli-Esposti, M., and Dive, C. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304, 455–461
6. Arnoult, D., Parone, P., Martinou, J. C., Antonsson, B., Estaquier, J., and Ameisen, J. C. (2002) *J. Cell Biol.* 159, 923–929
7. Arnoult, D., Gaume, B., Karbowski, M., Sharpe, J. C., Cecconi, F., and Youle, R. J. (2003) *EMBO J.* 22, 4385–4399
8. Zamzami, N., and Kroemer, G. (2003) *Curr. Biol.* 13, R71–R73
9. Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Jurgensmeier, J. M., Susin, S. A., Vieira, H. L., Prevost, M. C., Xie, Z., Matsuyama, S., Reed, J. C., and Kroemer, G. (1998) *Science* 281, 2027–2031
10. Narita, M., Shimizu, S., Ito, T., Chittenden, T., Lutz, R. J., Matsuda, H., and Tsujimoto, Y. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 14681–14686
11. Brenner, C., Le Bras, M., and Kroemer, G. (2003) *J. Clin. Immunol.* 23, 73–80
12. Brenner, C., Cadiou, H., Vieira, H. L., Zamzami, N., Marzo, I., Xie, Z., Leber, B., Andrews, D., Duclohier, H., Reed, J. C., and Kroemer, G. (2000) *Oncogene* 19, 329–336
13. Belzacq, A. S., Vieira, H. L., Verrier, F., Vandecasteele, G., Cohen, I., Prevost, M. C., Larquet, E., Pariselli, F., Petit, P. X., Kahn, A., Rizzuto, R., Brenner, C., and Kroemer, G. (2003) *Cancer Res.* 63, 541–546
14. Eskes, R., Antonsson, B., Osen-Sand, A., Montessuit, S., Richter, C., Sadoul, R., Mazzei, G., Nichols, A., and Martinou, J. C. (1998) *J. Cell Biol.* 143, 217–224
15. von Ahsen, O., Renken, C., Perkins, G., Kluck, R. M., Bossy-Wetzel, E., and Newmeyer, D. D. (2000) *J. Cell Biol.* 150, 1027–1036
16. Gogvadze, V., Robertson, J. D., Enoksson, M., Zhivotovsky, B., and Orrenius, S. (2004) *Biochem. J.* 378, 213–217
17. Antonsson, B., Conti, F., Ciavatta, A., Montessuit, S., Lewis, S., Martinou, I., Bernasconi, L., Bernard, A., Mermod, J. J., Mazzei, G., Maundrell, K., Gambale, F., Sadoul, R., and Martinou, J. C. (1997) *Science* 277, 370–372
18. Saito, M., Korsmeyer, S. J., and Schlesinger, P. H. (2000) *Nat. Cell Biol.* 2, 553–555
19. Schlesinger, P. H., Gross, A., Yin, X. M., Yamamoto, K., Saito, M., Waksman, G., and Korsmeyer, S. J. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 11357–11362
20. Shimizu, S., Ide, T., Yanagida, T., and Tsujimoto, Y. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 12321–12325
21. Epand, R. F., Martinou, J. C., Montessuit, S., and Epand, R. M. (2002) *Biochem. J.* 367, 849–855
22. Kuwana, T., Mackey, M. R., Perkins, G., Ellisman, M. H., Latterich, M., Schneiter, R., Green, D. R., and Newmeyer, D. D. (2002) *Cell* 111, 331–342
23. Roucou, X., Rostovtseva, T., Montessuit, S., Martinou, J. C., and Antonsson, B. (2002) *Biochem. J.* 363, 547–552
24. Shimizu, S., Narita, M., and Tsujimoto, Y. (1999) *Nature* 399, 483–487
25. Adachi, M., Higuchi, H., Miura, S., Azuma, T., Inokuchi, S., Saito, H., Kato, S., and Ishii, H. (2004) *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 287, G695–G705
26. Pavlov, E. V., Priault, M., Pietkiewicz, D., Cheng, E. H., Antonsson, B., Manon, S., Korsmeyer, S. J., Mannella, C. A., and Kinnally, K. W. (2001) *J. Cell Biol.* 155, 725–731
27. Guo, L., Pietkiewicz, D., Pavlov, E. V., Grigoriev, S. M., Kasianowicz, J. J., Dejean, L. M., Korsmeyer, S. J., Antonsson, B., and Kinnally, K. W. (2004) *Am. J. Physiol.* 286, C1109–C1117
28. Martinez-Caballero, S., Dejean, L. M., and Kinnally, K. W. (2004) *FEBS Lett.* 568, 35–38
29. Cartron, P. F., Moreau, C., Oliver, L., Mayat, E., Meflah, K., and Vallette, F. M. (2002) *FEBS Lett.* 512, 95–100
30. Guihard, G., Proteau, S., Payet, M. D., Escande, D., and Rousseau, E. (2000) *FEBS Lett.* 476, 234–239
31. Nowak, M., Gaines, G. C., Rosenberg, J., Minter, R., Bahjat, F. R., Rectenwald, J., MacKay, S. L., Edwards, C. K., 3rd, and Moldawer, L. L. (2000) *Am. J. Physiol.* 278, R1202–R1209
32. Zhao, Y., Li, S., Childs, E. E., Kuharsky, D. K., and Yin, X. M. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 27432–27440
33. Antonsson, B., Montessuit, S., Sanchez, B., and Martinou, J. C. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 11615–11623
34. Manon, S., Chaudhuri, B., and Guerin, M. (1997) *FEBS Lett.* 415, 29–32
35. Letai, A., Bassik, M. C., Walensky, L. D., Sorcinelli, M. D., Weiler, S., and Korsmeyer, S. J. (2002) *Cancer Cell* 2, 183–192
36. Brustovetsky, N., Tropschug, M., Heimpel, S., Heidkamper, D., and Klingenberg, M. (2002) *Biochemistry* 41, 11804–11811
37. Loupatatzis, C., Seitz, G., Schonfeld, P., Lang, F., and Siemen, D. (2002) *Cell Physiol. Biochem.* 12, 269–278
38. Scorrano, L., Ashiya, M., Buttle, K., Weiler, S., Oakes, S. A., Mannella, C. A., and Korsmeyer, S. J. (2002) *Dev. Cell* 2, 55–67
39. Karbowski, M., and Youle, R. J. (2003) *Cell Death Differ.* 10, 870–880
40. Forte, M., Adelsberger-Mangan, D., and Colombini, M. (1987) *J. Membr. Biol.* 99, 65–72
41. Zizi, M., Forte, M., Blachly-Dyson, E., and Colombini, M. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 1614–1616
42. Muro, C., Grigoriev, S. M., Pietkiewicz, D., Kinnally, K. W., and Campo, M. L. (2003) *Biophys. J.* 84, 2981–2989
43. Rostovtseva, T. K., Antonsson, B., Suzuki, M., Youle, R. J., Colombini, M., and Bezrukov, S. M. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 13575–13583
44. Mandel, N., Mandel, G., Trus, B. L., Rosenberg, J., Carlson, G., and Dickerson, R. E. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 4619–4636
45. Henry, J. P., Juin, P., Vallette, F., and Thieffry, M. (1996) *J. Bioenerg. Biomembr.* 28, 101–108
46. Pelleschi, M., Henry, J. P., and Thieffry, M. (1997) *J. Membr. Biol.* 156, 37–44
47. Wirth, A., Jung, M., Bies, C., Frien, M., Tyedmers, J., Zimmermann, R., and Wagner, R. (2003) *Mol. Cell* 12, 261–268
48. Lemeshko, S. V., and Lemeshko, V. V. (2004) *Mol. Cell Biochem.* 256-257, 127–139
49. Doyle, D. A., Morais-Cabral, J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., and MacKinnon, R. (1998) *Science* 280, 69–77
50. Hille, B. (1992) *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 2nd Ed., Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA
51. Antonsson, B., Montessuit, S., Lauper, S., Eskes, R., and Martinou, J. C. (2000) *Biochem. J.* 345, 271–278
52. Roucou, X., Montessuit, S., Antonsson, B., and Martinou, J. C. (2002) *Biochem. J.* 368, 915–921
53. Gross, A., Jockel, J., Wei, M. C., and Korsmeyer, S. J. (1998) *EMBO J.* 17, 3878–3885
54. Desagher, S., Osen-Sand, A., Nichols, A., Eskes, R., Montessuit, S., Lauper, S., Maundrell, K., Antonsson, B., and Martinou, J. C. (1999) *J. Cell Biol.* 144, 891–901
55. Nechushtan, A., Smith, C. L., Hsu, Y. T., and Youle, R. J. (1999) *EMBO J.* 18, 2330–2341
56. Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B., and Martinou, J. C. (2000) *Mol. Cell. Biol.* 20, 929–935
57. Moczydlowski, E. (1986) in *Ion Channel Reconstitution* (Miller, C., ed) pp. 75–113, Plenum Press, New York

C. Commentaires et résultats complémentaires

Dans le modèle décrit dans l'article ci-dessus le MAC est donc retrouvé dans des membranes mitochondriales issues de foies apoptotiques de rats, ce qui confirme bien que l'existence de ce méga-canal dans des conditions physiologiques d'induction de l'apoptose. Chose intéressante dans ce modèle, la purification de mitochondries de ces foies apoptotiques a mis en évidence l'existence de trois populations distinctes de mitochondries séparées sur un gradient de percoll en fonction de leur densité. Parmi ces populations on trouve une population de hautes densité (nommée HAM: **H**eavy **A**poptotic **M**itochondria) similaire en terme de densité à la population mitochondriale issue d'un foie sain (nommée HCM: **H**eavy **C**ontrol **M**itochondria). En plus de cette population de haute densité deux autres population de plus faibles densités sont isolées: une population très peu denses constituées de mitochondries dont le volume a énormément augmenté (nommée LAM2: **L**ight **A**poptotic **M**itochondria **2**) et une population dont la densité est intermédiaire à celles des fractions HAM et LAM2 (nommée LAM1: **L**ight **A**poptotic **M**itochondria **1**).

L'activité électrophysiologique du MAC retrouvée dans ce modèle présente bien les mêmes caractéristiques identifiées dans les études précédentes réalisées à partir de membranes mitochondriales de cellules FL5.12 induites en apoptose. Sa conductance est proche de 3 nS ce qui correspondrait à un diamètre de pore moyen de 4,6 nm. De plus la sensibilité au cytochrome c est retrouvée dans ce modèle. Le fait de retrouver cette activité MAC dans un nouveau modèle dans des conditions d'induction d'apoptose permet de confirmer que le MAC est bien une entité existante lors du mécanisme apoptotique impliquant la voie mitochondriale.

En ce qui concerne les trois populations de mitochondries apoptotiques isolées, elles semblent correspondre à différents stades chronologiques de la voie mitochondriale de l'apoptose dans la mesure où la caractérisation biochimique de ces fractions montre une perte progressive du cytochrome c de la fraction HAM vers la fraction LAM2 (***article**, figure 3A*). Ce qui est plus surprenant c'est que la signature de l'activité du MAC n'est retrouvée uniquement que dans la fraction LAM2, or cette population mitochondriale présente déjà un déficit significatif en cytochrome c et l'analyse biochimique révèle que les fractions HAM et LAM1 ont déjà perdu des quantité conséquentes de cytochrome c. Ce résultat ne permet donc pas de dire que l'activité du MAC est responsable de la libération du cytochrome c. Malgré tout, à la vue des résultats décrits dans ce modèle *in vivo* il apparaît que l'activité du MAC est un évènement tardif de la voie mitochondriale de l'apoptose qui possède la capacité physique de laisser passer le cytochrome c mais n'est vraisemblablement pas impliqué dans la libération précoce de celui-ci.

En ce qui concerne l'identité moléculaire de ce canal, jusqu'à ce point aucune preuve n'avait été apportée. Dans le cas de ce modèle de foie de rat apoptotique, une des hypothèses qui pouvait être envisagée était le cas d'une modulation d'une activité canal pré-existente sur la membrane externe de la mitochondrie, ce type de modèle ayant déjà été évoqué pour expliquer le mécanisme de perméabilisation dépendant de Bax. Parmi les protéines possédant une activité canal sur la membrane externe on peut penser aux protéines VDAC et Tom40 qui sont des composants essentiels de cette même membrane. Afin de vérifier si ce type d'hypothèse pouvait s'avérer plausible, une approche par cross-linking a été utilisée pour déceler une possible évolution du niveau de complexation des protéines VDAC et Tom40 (figure 1). Pour le VDAC il n'est observé aucun changement de masse moléculaire après cross-linking et pour aucune des fractions mitochondriales contrôle (HCM) et apoptotiques (HAM, LAM1 et LAM2). En ce qui concerne le Tom40 il n'y également que très peu d'évolution au

niveau de sa masse moléculaire après cross-linking bien que l'on observe un complexe de 50 kDa dans la fraction HCM qui semble disparaître dans les fractions apoptotiques. Ce complexe de 50 kDa pourrait être un complexe Tom40/Tom22 qui se dissocierait en partie au cours de l'évolution du phénotype HAM vers le phénotype LAM2. Ceci pourrait s'accorder avec les résultats du chapitre I présentant l'interaction de Bax avec Tom22. D'autres variations sont observées au niveau du monomère de Tom40 qui pourrait être dû à l'association avec une petite protéine Tom. Bien que cela ne représente pas une preuve formelle, rien dans l'analyse des résultats de cross-linking de VDAC et Tom40 ne permet d'imaginer une évolution au niveau de ces protéines susceptible d'être synonyme d'une potentielle modulation de leur activité au cours de l'apoptose.

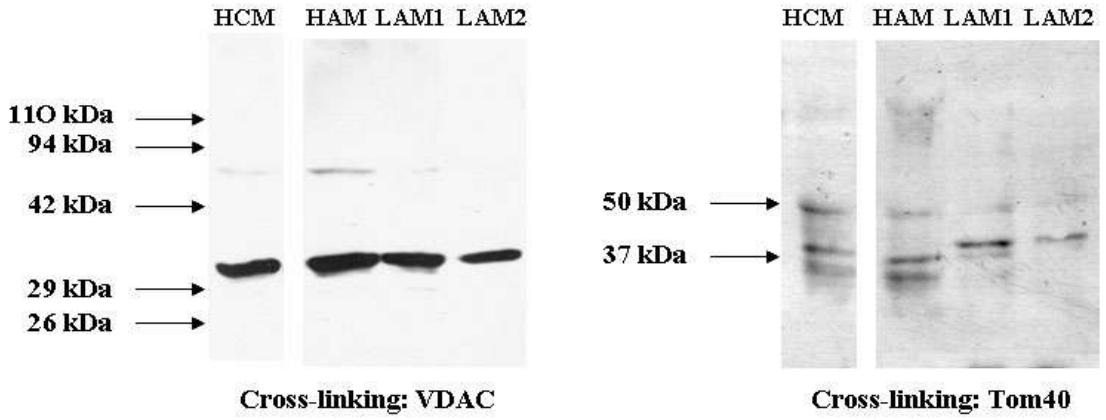


Figure 1: Analyse par cross-linking de l'évolution des protéines VDAC et Tom40 au sein des différentes fractions. Cross-linking réalisé sur les mitochondries de foie de rat contrôle (HCM) et apoptotiques (HAM, LAM1 et LAM2). Analyse de l'évolution de complexes potentiels contenant les protéines VDAC (à droite) et Tom40 (à gauche). Le cross-linker utilisé est le DSS à 1 mM.

En revanche la perte progressive du cytochrome c et l'apparition du MAC coïncide avec l'augmentation du niveau d'oligmérisation du Bax mitochondrial (***article**, figure 3B*). Effectivement le MAC n'est présent que dans la fraction LAM2 mais c'est aussi cette fraction qui possède le plus haut niveau d'oligomérisation de Bax. Ceci pourrait donc constituer un lien entre le MAC et Bax. Dans une étude plus récente il a en effet été démontré que Bax est un composant du MAC, plus précisément ce sont des oligomères de Bax qui sont retrouvés en tant que composants du MAC (**Dejean *et al.*, 2005**). En outre dans cette étude l'utilisation de cellules déficientes en Bax montre que l'absence n'est pas suffisante pour bloquer l'apparition du MAC au cours de l'apoptose et que seules des cellules déficientes en Bax et Bak ne présentent pas d'activité MAC lorsqu'elles sont induites en apoptose. Ceci suggère donc que Bak aussi serait susceptible d'être à l'origine d'une activité MAC. Ceci correspond bien également aux résultats obtenus dans le modèle de foie de rat apoptotique où l'on observe, comme pour Bax, une augmentation du niveau d'oligomérisation de Bak au sein des différentes fractions mitochondriales isolées et culminant dans la population LAM2 (figure 2). Donc le plus haut niveau d'oligomérisation de Bak coïncide également avec l'apparition du MAC. Ceci rentre donc bien également dans le cadre de l'étude de Dejean *et al.* Montrant que Bak serait également impliqué dans la formation du MAC.

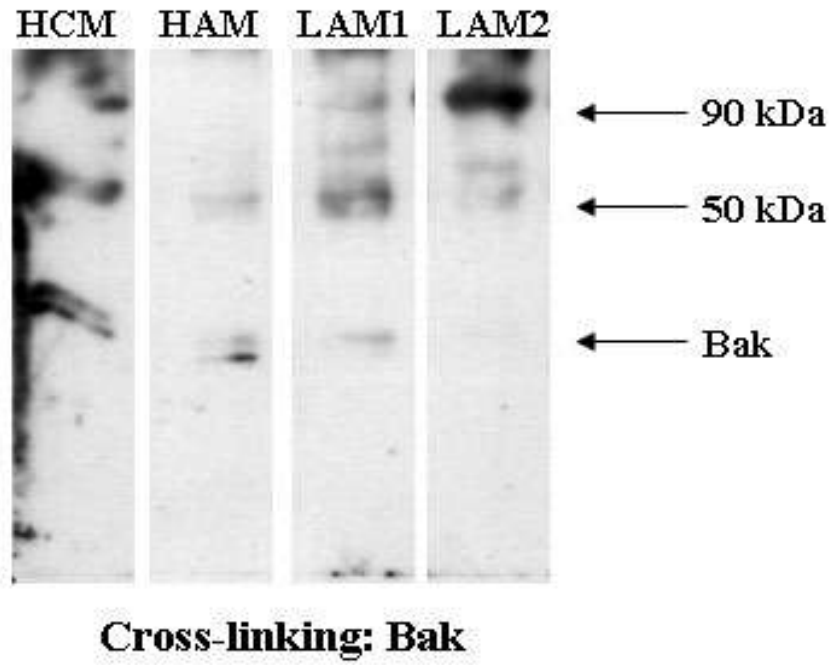


Figure 2: Analyse par cross-linking de l'oligomérisation de Bak. Cross-linking réalisé sur les mitochondries de foie de rat contrôle (HCM) et apoptotiques (HAM, LAM1 et LAM2). Analyse de l'évolution du niveau d'oligomérisation de Bak. Le cross-linker utilisé est le DSS à 1 mM.

Donc comme il vient d'être énoncé et à la lumière des résultats obtenus par le groupe de K. Kinnally on peut donc conclure que l'activité MAC est bien une activité apparaissant au cours de l'apoptose et qui est directement liée à la formation d'oligomères de Bax et de Bak qui sont les composants essentiels de ce canal. Bien que l'on distingue bien des homo-oligomères de Bax et de Bak qui soient liées à l'apparition du MAC, il reste difficile de déterminer si chaque type d'homo-oligomère, en conditions physiologiques, peut générer une activité MAC ou si le MAC est le résultat d'une coopération entre ces deux types d'oligomères. Le travail du groupe de K. Kinnally a permis de mettre en évidence que les oligomères de Bax peuvent générer une activité similaire au MAC. En outre comme l'absence de Bax ne bloque pas l'apparition du MAC, il semble clair que Bak joue un rôle dans la formation de ce méga-canal, d'autant que l'absence de Bax et de Bak prévient totalement l'apparition du canal. Il aurait été intéressant dans ce travail d'inclure l'utilisation d'un modèle de cellules déficientes en Bak. Cependant leurs résultats montrent que l'immunodéplétion de Bax semble également provoquer presque totalement la disparition de l'activité du MAC, ce qui peut s'expliquer par le fait qu'en immunoprécipitant Bax ils entraînent également du Bak. Donc en terme d'organisation moléculaire du MAC il semblerait que son fonctionnement serait plutôt le résultat d'une coopération entre les deux types d'homo-oligomères. Bien qu'il ne semble pas exister d'hétéro-dimère Bax/Bak, il a déjà été rapporté qu'une association entre les oligomères de Bax et de Bak soit possible (**Mikhailov *et al*., 2003**).

En revanche en ce qui concerne le rôle du MAC dans la libération du cytochrome c, cela reste plus controversé. A la vue des résultats de notre modèle de foie de rat, il apparaît clairement que le cytochrome c est libéré avant que le MAC apparaisse. Cette observation a été rendue possible par la purification de trois populations bien distinctes de mitochondries apoptotiques qui à priori peuvent cohabiter au sein d'une même

cellule mais qui représentent trois stades chronologiques distincts de la voie mitochondriale de l'apoptose. L'ensemble de ces résultats conduit à conclure que l'activité MAC est un événement tardif de la voie intrinsèque qui n'est pas impliqué dans la libération du cytochrome c qui a lieu très précocement lors de la mort cellulaire. L'explication possible est que l'apparition du MAC est probablement liée à des très hauts degrés d'oligomérisation de Bax et de Bak alors que des niveaux d'oligomérisation plus faibles sont suffisants pour induire la libération de cytochrome c sans pour autant induire l'apparition d'une activité de type MAC.

CHAPITRE III

Association de Bak à la mitochondrie: mise en évidence de nouveaux partenaires protéiques et mécanisme moléculaire de la mort induite par Bak

A. Avant-propos

Comme il a été explicité en introduction, le mode d'action par lequel Bak induit la mort cellulaire est très peu documenté comparé à Bax. Il est d'ores et déjà connu que lors de l'apoptose Bak subi un changement de conformation dévoilant son domaine N-terminal et son domaine BH1 (**Griffiths *et al*., 2001**). En outre, tout comme Bax, Bak possède la capacité de s'auto-activer après induction du processus apoptotique (**Ruffolo & Shore, 2003**). Cependant bien qu'homologues pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2 des études ont montré que Bax et Bak ne possèdent pas des rôles redondants lors d'une induction apoptotique (**Cartron *et al*., 2003a**). La première différence flagrante se situe au niveau de la localisation de Bak qui est retrouvé surtout sur la membrane externe de la mitochondrie en conditions normales et en conditions apoptotiques (**Griffiths *et al*., 1999**) (**Wei *et al*., 2000**). Cette localisation au niveau de la membrane dont il cause la perméabilisation lors de l'apoptose est surprenante car les premières études portant sur Bak ont montré que l'expression forcée de Bak ectopique dans des fibroblastes et des neurones sympathiques induit une apoptose rapide et massive des cellules (**Chittenden *et al*., 1995b**) (**Farrow *et al*., 1995**). Ceci n'est pas observé lors d'une surexpression de Bax ce qui suggère donc que Bak, même en conditions non apoptotiques, n'est pas complètement inactif contrairement à la forme soluble monomérique de Bax. Ces observations impliquent donc l'existence de facteurs mitochondriaux permettant de bloquer l'activité pro-apoptotique intrinsèque de Bak et le maintenant ainsi dans un état inactif au niveau de la membrane externe. Ainsi des rapports montrent que Bak réside au sein de gros complexes mitochondriaux en conditions non apoptotiques (**Mikhailov *et al*., 2003**).

Ce n'est que récemment que certains rapports ont permis d'avancer un certains nombre d'explications sur la façon dont Bak est fortement régulé au niveau de la membrane externe mitochondriale en conditions non apoptotiques au travers d'interactions impliquant d'autres facteurs protéiques. La première catégorie de facteurs impliqués dans cette régulation négative correspond à des membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2. En effet dans des conditions normales Bak semble être maintenu dans un état inactif par les protéines Mcl-1 et la fraction mitochondriale de Bcl-x_L (**Griffiths *et al*., 1999**) (**Willis *et al*., 2005**). La disruption de ces hétéro-dimères au cours de l'apoptose nécessiterait alors l'intervention de protéines à BH3 (**Moreau *et al.*, 2003**) et en effet le travail de Willis *et al.* (**2005**) démontre que la protéine à BH3 Noxa interagit avec Mcl-1 et induit sa dégradation par le protéasome, libérant ainsi Bak de son partenaire antagoniste. En revanche le complexe Bcl-x_L/Bak serait dissocié par l'entremise d'une autre protéine à BH3 que Noxa puisque celle-ci n'interagit pas avec Bcl-x_L. Le candidat potentiel pour la dissociation de l'hétéro-dimère Bcl-x_L/Bak pourrait être la forme tronquée de Bid qui est capable d'activer la protéine Bak (**Wei *et al*., 2000**) (**Ruffolo & Shore, 2003**) (**Cartron *et al*., 2003a**) et sachant que le changement de conformation de Bak est suivi de la dissociation de Bak et de Bcl-x_L (**Griffiths *et al*., 2001**). En outre il semblerait que le changement de conformation de Bak lors de son activation augmente la possibilité de formation d'hétéro-dimères Bcl-2/Bak (**Ruffolo & Shore, 2003**). L'ensemble de ces résultats suggère donc que Bak apparaît être très fortement régulé, en conditions normales et apoptotiques, par les membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2. Cependant un autre type de régulation négative de l'activité de Bak n'impliquant pas de membres de la famille de Bcl-2 a également été mis en évidence récemment. En effet des expériences de cross-linking ont permis l'identification d'un complexe de 60 kDa composé de Bak et de l'isoforme 2 du VDAC (**Cheng *et al*., 2003**). Ce complexe existe en conditions non-apoptotiques et est dissocié lors de l'activation de Bak par une protéine à BH3 comme tBid par exemple. En outre il apparaît que les domaines BH3

et BH1 de Bak soit impliqué dans la formation de ce complexe. L'analyse de la fonctionnalité du complexe Bak/VDAC2, par l'utilisation de cellules dont l'expression de VDAC2 est éteinte, révèle que ces cellules sont plus sensibles à l'induction de l'apoptose par traitement à la straurosporine et présentent une accélération de la libération du cytochrome c. Ainsi la protéine VDAC2 apparaît également en tant que régulateur de l'activité de Bak. Il semble exister un autre type de régulation de Bak et impliquant son homologue pro-apoptotique Bax. En effet comme il a été décrit précédemment Bax et Bak forment des homo-oligomères après avoir été activés au cours de l'apoptose et bien qu'aucun hétéro-oligomère Bax/Bak ne semble exister il apparaît malgré tout qu'une association entre les deux types d'homo-oligomères puisse être observée (**Mikhailov *et al*., 2003**). Le plus remarquable dans cette observation faite par Mikhailov *et al.* est que la déplétion en ATP par hypoxie de cellules $Bax^{-/-}$ résulte en une disparition des homo-oligomères de Bak ainsi qu'une très forte inhibition de la libération de cytochrome c. En revanche dans le cas de l'utilisation de cellules $Bak^{-/-}$, l'oligomérisation de Bax est seulement retardée et le processus apoptotique se déroule normalement. Ces résultats semblent donc suggérer que dans une condition hypoxique Bax semble exercer sur Bak un rôle de régulateur fonctionnel. De plus une étude récente montre que la déficience en Bax induit une diminution de la formation du complexe Bak/VDAC2 (**Chandra *et al*., 2005**). Cette étude soutient le fait que Bak devient l'effecteur pro-apoptotique majeur en cas d'absence de Bax comme il a déjà été décrit auparavant (**Cartron *et al*., 2003a**). Ainsi la déficience en Bax entraînant une moindre régulation de Bak par VDAC2 il est possible d'émettre l'hypothèse qu'il existe une régulation Bax-dépendante de la fonction et de l'association mitochondriale de Bak.

Pour résumer les faits connus sur Bak il faut donc noter que celui-ci est régulé et/ou séquestré de façon très importante au niveau de la membrane externe de la mitochondrie, ceci étant probablement dû au fait de sa capacité intrinsèque à induire la mort cellulaire sans avoir été activé. Cette régulation étroite de la fonction de Bak est certainement une des raisons pour lesquelles sa capacité à induire l'apoptose apparaît moins efficaces que celle de Bax. Néanmoins Bak semble agir de façon synergique avec Bax pour former des pores dans la membrane externe mitochondriale. Le travail présenté ci-après a donc pour but essentiel d'étudier la manière précise dont Bak s'associe avec la mitochondrie en conditions normales et en conditions apoptotiques avec en point de mire la mise en évidence de récepteurs mitochondriaux potentiels de cette protéine comme il a été réalisé pour l'étude de Bax et Tom22. Le second but recherché est de mettre en évidence les points clés de la mort induite par Bak se produisant précocement suite à l'activation de ce dernier et ceci en vue de proposer un modèle de mécanisme moléculaire précoce de l'apoptose Bak-dépendante.

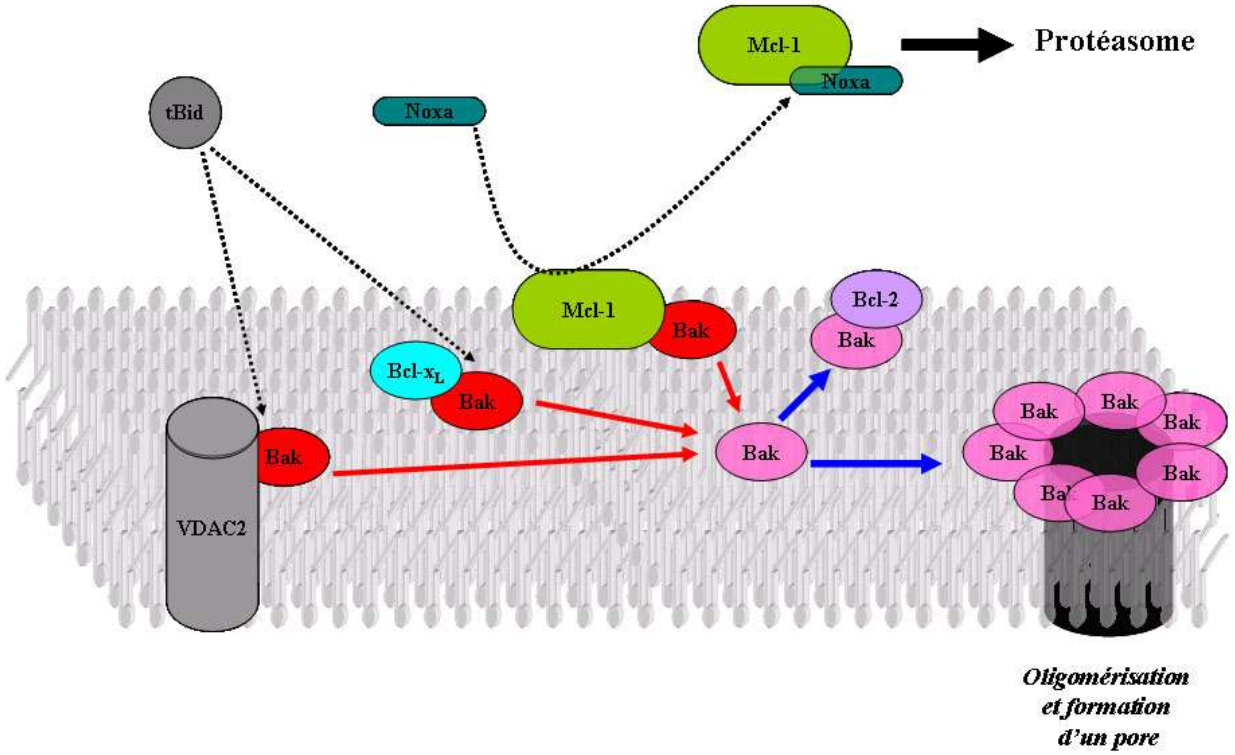


Figure 1: Régulation de Bak sur la membrane externe de la mitochondrie. L'action de tBid permet de disrupter le complexe VDAC2/Bak et potentiellement l'hétéro-dimère Bcl-x_L/Bak tandis que Noxa permet la dissociation de l'hétéro-dimère Mcl-1/Bak entraînant la dégradation de Mcl-1 par le protéasome. Le Bak ainsi libéré et activé peut s'oligomériser pour induire la formation de pores membranaires cependant l'action de la forme active de Bak peut également être antagonisé par la formation d'un hétéro-dimère Bcl-2/Bak.

B. Mise en évidence de nouveaux partenaires mitochondriaux de Bak

1. Criblage par tests acellulaires de partenaires protéiques potentiels de Bak

Une première approche a été faite en étudiant l'association de Bak radiomarqué avec des mitochondries isolées incubées au préalable avec des quantitées non saturantes (2 µg) ou saturantes (15 µg) d'anticorps dirigés contre diverses protéines de la membrane externe de la mitochondrie et ce en vue de bloquer les sites potentiels nécessaires à l'association de Bak. Parmi les protéines ainsi testées se trouvent le récepteur mitochondrial aux benzodiazépines (PBR), les récepteurs Tom20 et Tom22 du complexe TOM qui sont respectivement des partenaires de Bcl-2 et Bax, et les metaxines 1 et 2 décrites originellement comme potentiels récepteurs de précurseurs protéiques importés dans la mitochondrie et ainsi lié au processus d'importation.

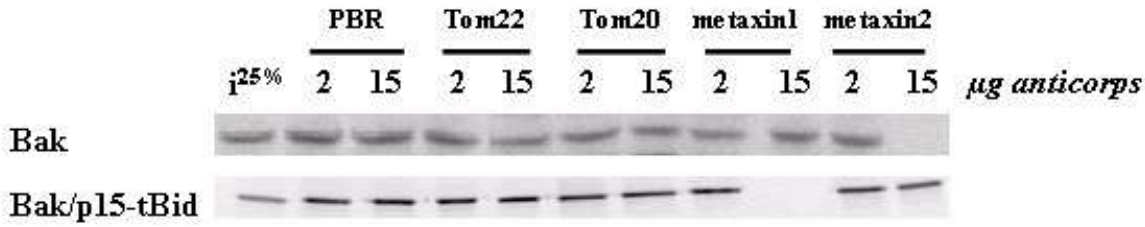


Figure 2: Association de Bak radiomarqué sur des mitochondries isolées de foie de rat pré-incubées avec des anticorps ciblant diverses protéines de la membrane externe. Le Bak utilisé pour l'association est ajouté aux mitochondries tel quel après sa synthèse *in vitro* ou est activé au préalable par du tBid.

Ces tests acellulaires ont permis d'observer que l'association de Bak n'est pas sensible à la saturation préalable du PBR, de Tom20, de Tom22 et de la metaxine 1 (figure 1). En revanche le Bak natif ne s'associe plus à des mitochondries saturées par un anticorps anti-metaxine 2, ceci suggérant ainsi un rôle de la metaxine 2 dans la localisation mitochondriale de Bak en conditions normales. En revanche lorsque des conditions de type apoptotique sont simulées par l'activation préalable de Bak par la forme p15 tronquée de Bid, le profil d'association de Bak sur ces mêmes tests acellulaires change. En effet bien que Bak reste toujours insensible à la saturation du PBR et des récepteurs Tom, il devient également capable de s'associer aux mitochondries isolées saturées par l'anti-metaxine 2. Dans le cas de l'activation par p15-tBid l'inhibtion de l'association de Bak intervient lorsque les mitochondries ont été saturées par un anticorps anti-metaxine 1 (figure 1).

Ainsi ces tests acellulaires permettent de mettre en évidence un nouveau couple de protéines impliquées dans l'association de Bak avec la membrane externe mitochondriale: les metaxines 1 et 2. Bien que le fait de rajouter du Bak sur les mitochondries ne reproduise pas exactement des conditions physiologiques pour lesquelles celui-ci est constituvemnt localisé sur la mitochondrie, ces résultats indiquent néanmoins que ces protéines ont un lien avec dans le mécanisme d'association de Bak avec la membrane externe. Dans la mesure ou tBid a été décrit comme induisant le changement de conformation de Bak au cours de l'apoptose il apparaît que ce changement de conformation ou activation peut se traduire également par un changement de partenaire protéique lors de l'induction du processus apoptotique: Bak interagit préférentiellement avec la metaxine 2 en condition non apoptotique et la modification structurale subie au cours de son activation le conduit à se désengager de sa liaison avec son premier partenaire protéique et privilégie alors une interaction avec la metaxine 1.

Comme il a été décrit dans l'introduction les metaxines sont un couple protéique dont une, la metaxine 1, est ancrée dans la membrane externe par un domaine transmembranaire et interagit avec la metaxine 2 qui elle est une protéine périphérique (**Armstrong** *et al.***, 1999**). Des investigations sur le rôle de la metaxine 1 ont montré que celle-ci est impliquée dans le mécanisme d'importation mitochondrial (**Armstrong** *et al.***, 1997**). En outre la metaxine 1 et la metaxine 2 apparaissent être respectivement les homologues des protéines Mas37 et Sam35, identifiées chez la levure, et appartenant au complexe SAM chargé du transfert horizontal et de l'assemblage dans la membrane externe de certains précurseurs importés via le complexe de translocation TOM. Les metaxines selon toute vraissemblance appartiennent donc à la machinerie globale d'importation de la membrane externe composée des complexes TOM et SAM. Ceci est un point intéressant car il apparaît ainsi que cette

machinerie d'importation constitue un point de convergence des protéines pro-apoptotiques effectrices Bax et Bak qui donc interagissent respectivement avec Tom22 et les metaxines. Ceci semble même pouvoir se généraliser à d'autres membres de cette famille puisque Bcl-2 est un partenaire protéique de Tom20. Bien que cette convergence vers la machinerie d'importation puisse représenter un point commun entre Bax et Bak, leur partenaires protéiques distincts et appartenant à des complexes différents indiquent cependant que le mécanisme par lequel ils s'associent avec la mitochondrie sont différents. Cela évoque également des mécanismes moléculaires différents impliqués dans l'insertion membranaire de Bak et de Bax lors des étapes précoces de la voie mitochondriale de l'apoptose et précédant les processus d'auto-activation, d'oligomérisation et de perméabilisation. Ces premiers résultats semblent donc appuyer les rôles non redondants que peuvent présenter Bax et de Bak au cours de l'apoptose.

2. Recherche de domaines de Bak impliqués dans son association avec la mitochondrie

Afin d'avoir une meilleure idée sur la manière dont Bak s'associe avec la mitochondrie et/ou ses récepteurs potentiels, de nouveaux tests d'association avec des mitochondries issues de cellules de glioblastome déficientes en Bax et en Bak ont été réalisés pour comparer l'association d'un Bak wild-type à l'association de diverses formes tronquées ou mutées de Bak. Ces formes de Bak sont des formes délétées de la partie N-terminale ($Bak^{\Delta N}$), des 69 premiers résidus ($Bak^{\Delta 1-69}$), de la partie C-terminale ($Bak^{\Delta C}$) et un mutant du domaine BH1 (double mutation E120K-N124S; Bak^{mBH1}). L'association de ces diverses formes a été testée sur des mitochondries isolées seules ou saturées au préalable par des anticorps anti-metaxine 1 ou 2 ou anti-VDAC2. L'insertion membranaire de ces diverses formes de Bak a également été vérifiée par un traitement alcalin suivant l'étape d'association.

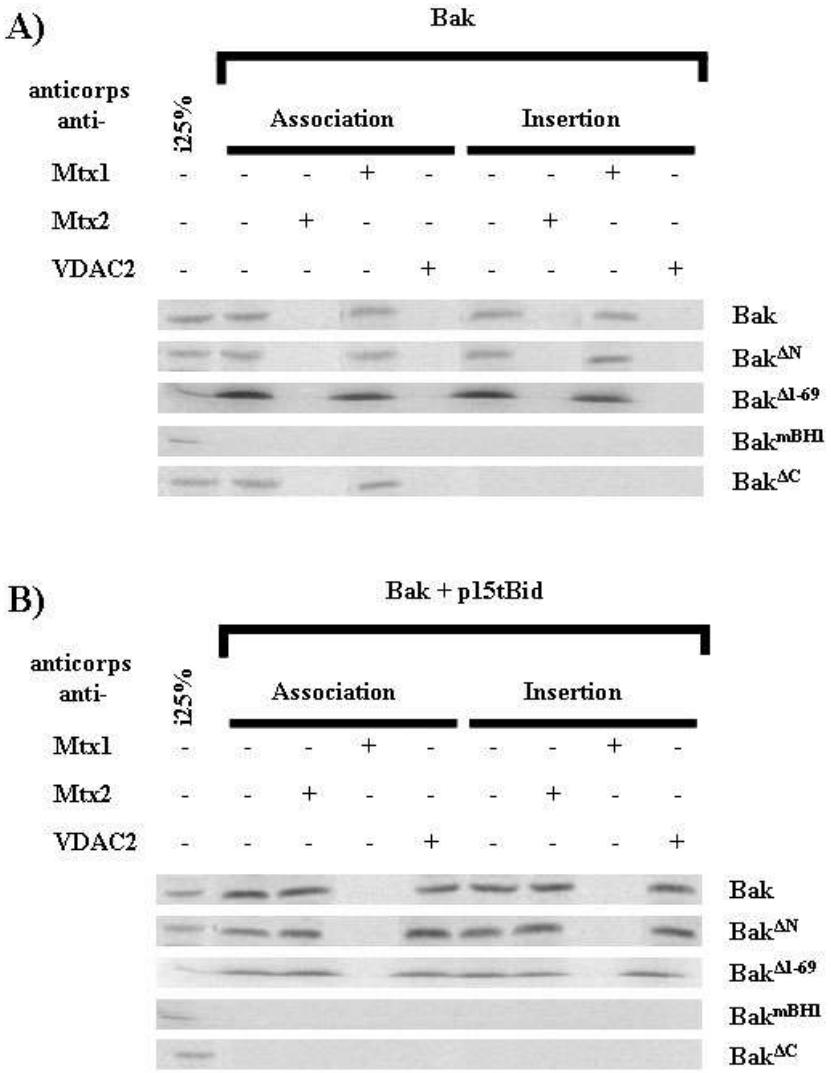


Figure 3: Association de Bak et des ses formes délétées ou mutées sur des mitochondries de GBM déficientes en Bax et en Bak. A) Association de différentes formes de Bak sur des mitochondries isolées seules ou saturées soit par un anticorps anti-metaxine 1, anti-metaxine 2 ou anti-VDAC2. L'insertion membranaire est également évaluée par traitement alcalin. B) Même étude que précédemment mais réalisée avec un prétraitement des différentes formes de Bak par du p15-tBid.

Comme le montre les résultats obtenus (figure 3A), le Bak full-length s'associe sur mitochondries seules ou saturées par l'anticorps anti-metaxine 1 mais pas dans le cas d'une saturation par un anti-metaxine 2 ou un anti-VDAC2. Le traitement alcalin nous indique également que Bak est inséré dans la membrane mitochondriale lorsque l'on observe une association, suggérant ainsi qu'en conditions non-apoptotiques Bak est déjà intégré dans la membrane confirmant son son statut de protéine intégrale de la membrane mitochondriale déjà décrit. Dans les tests acellulaires effectués avec les formes $Bak^{\Delta N}$ et $Bak^{\Delta 1-69}$ il est observé que celles-ci se comportent exactement comme le Bak full-length. Le mutant Bak^{mBH1} ne possède plus la capacité de s'associer à la mitochondrie. Enfin le $Bak^{\Delta C}$ semble pouvoir s'associer à la mitochondrie sauf si il y a saturation préalable par des anticorps anti-metaxine 2 ou anti-VDAC2 mais le traitement alcalin indique que cette forme n'est plus insérée dans la membrane mitochondriale.

Lorsque l'on étudie la capacité de s'associer à la mitochondrie d'un Bak full length traité par du p15-tBid, l'observation confirme que la saturation des sites VDAC2 et metaxine 2 n'a plus d'effet inhibiteur sur son association et que seule une saturation des sites metaxine 1 bloque l'association de la forme activée de Bak. Comme observé précédemment les formes $Bak^{\Delta N}$ et $Bak^{\Delta 1\text{-}69}$ suivent le même schéma d'association que le Bak full length activé. Le mutant Bak^{mBH1} reste incapable de s'associer avec la mitochondrie dans tous les cas de figure. Enfin pour la forme $Bak^{\Delta C}$ traitée par du p15-tBid elle se comporte exactement comme le mutant Bak^{mBH1} alors qu'en abscence d'activation elle apparaît être compétente pour s'associer à la mitochondrie mais incapable de s'y insérer.

Ces résultats nous apprennent plusieurs choses, la première étant que l'association décrite par le groupe de Korsmeyer entre Bak et le VDAC2 y est reproduite puisque la saturation de mitochondries par un anticorps dirigé contre le VDAC2 empêche l'association mitochondriale de Bak mais pas celle de Bak activé par p15-tBid. Les autres informations viennent de la comparaison entre l'association du Bak full length et celles des formes tronquées ou mutées. La délétion de la partie N-terminale de Bak n'entraîne pas de modification concernant sa capacité à s'associer à la mitochondrie et à s'insérer dans la membrane ce qui constitue une première différence importante avec Bax. En effet l'étude de la forme de Bax délétée de son N-terminal ou du variant Bax Ψ montre que cela entraîne une augmentation de son association mitochondriale et ainsi une relocalisation de Bax du cytosol vers la mitochondrie. Ceci n'est pas le cas pour Bak suggèrant ainsi que sa partie N-terminale n'est pas impliquée dans la régulation de son association. Dans le cas de $Bak^{\Delta 1\text{-}69}$ le même résultat que précédemment est observé. La délétion des 69 premiers résidus de Bak correspond à une délétion de son extrémité N-terminale et de sa première hélice α ou Hα1. Ce Bak tronqué a été réalisé afin de le comparer avec le mécanisme d'association de Bax impliquant une séquence d'adressage située dans son Hα1. Dans le cas de Bax la délétion de l'Hα1 conduit à une incapacité de celui-ci de s'associer avec la mitochondrie. Dans la mesure ou $Bak^{\Delta 1\text{-}69}$ s'associe et s'insert toujours de façon comparable a un Bak full length ceci conduit donc à dire que contrairement à Bax il n'y a pas de séquence d'adressage mitochondriale dans l'Hα1 de Bak.

La mutation du domaine BH1 de Bak entraîne une perte totale de la capacité de ce dernier à s'associer et s'insérer dans la membrane mitochondriale. Dans leur étude sur l'interaction de Bak avec le VDAC2 Cheng *et al.* avaient déjà observé, en utilisant des systèmes cellulaires murins exprimant des mutants de Bak, que la mutation du BH3 empêche la formation du complexe mais aussi que la mutation du BH1 réduit drastiquement la quantité de complexe Bak/VDAC2. Ces résultats semblent donc suggérer que le BH1 jouerait plus un rôle dans l'interaction de Bak avec ses partenaires protéiques mitochondriaux que dans l'adressage même de celui-ci à la membrane mitochondriale. Ceci peut être supporter par le fait que le changement de conformation de Bak lors de l'apoptose conduit à l'exposition de son domaine BH1, or selon les structures protéiques connues de Bax et Bcl-x_L ce domaine recouvre une partie de l'Hα5 de ces protéines. On sait également que l'Hα5 avec l'Hα6 constitue le domaine de formation du pore de ces protéines, le dévoilement du BH1 de Bak lors de son activation pourrait donc refléter le déploiement de ces hélices lors l'insertion membranaire de Bak dans sa forme apoptogénique. Dans la mesure où Bak présente une capacité intrinsèque à induire la mort et qu'il apparaît être neutralisé au niveau mitochondrial par des interactions mettant en jeu d'autres protéines, il est possible d'imaginer que ces interactions pourraient impliquer le domaine BH1 de Bak formant ainsi une sorte de verrou empêchant l'insertion des hélices capables d'induire la formation de pores membranaires et la perméabilisation mitochondriale

résultante. Cette forme de cadenas ne serait ainsi ouverte que lors de l'interaction de Bak avec des activateurs comme tBid libérant ainsi le potentiel apoptogénique de Bak.

Enfin pour ce qui est du domaine C-terminal de Bak il semble que celui-ci puiise bien jouer un rôle dans l'association mitochondriale mais d'une façon différente que le domaine BH1. En effet le $Bak^{\Delta C}$ non actif peut s'associer à la mitochondrie et cette association est inhibée par des anticorps dirigés contre le VDAC2 et la metaxine 2 mais lorsque l'on vérifie son statut de protéine intégrale par traitement alcalin alors il apparaît que le $Bak^{\Delta C}$ n'est plus inséré et se comporte donc comme une protéine périphérique associée à la membrane externe par le biais d'interactions avec des protéines mitochondriales. Le domaine C-terminal de Bak étant remarquablement hydrophobe, il peut s'insérer dans une membrane lipidique et son rôle en tant que possible domaine d'ancrage transmembranaire a déjà été évoqué (**Martinez-Senac *et al.*, 2002**). Ceci semble se confirmer à la vue de résultats des tests acellulaires qui suggèrent ainsi que le Bak en conditions non apoptotiques est ancré dans la membrane par son domaine C-terminal et que ce domaine n'est pas impliqué dans les interactions de Bak avec la metaxine 2 et le VDAC2. Ce comportement de $Bak^{\Delta C}$ se trouve modifié lorsqu'il est activé au préalable par du p15-tBid puisque dans ce cas il ne peut même plus s'associer à la mitochondrie ce qui suggère un rôle important du C-terminal de Bak dans sa fontion pro-apoptotique. Ceci peut s'expliquer de deux façons, la première étant que le domaine C-terminal joue un rôle essentiel dans l'insertion de la forme active de Bak mais ceci ne s'accorde pas totalement aux modèles décrits pour Bcl-2, Bcl-x_L et Bax qui montrent que lors du processus apoptotique le changement de conformation subit par ces protéines conduit à l'insertion de celles-ci essentiellement par le biais de leurs hélices Hα5 et Hα6 (**Kim *et al.*, 2004**) (**Cartron *et al.*, 2005**) (**Thuduppathy *et al.*, 2006**). En outre leur implication dans la formation du pore généré par Bax suggère fortement que Bak doit suivre le même type de schéma pour induire la perméabilisation mitochondriale. Cependant il ne peut être totalement exclu que l'ancre membranaire représentée par le C-terminal soit essntiel pour que ces deux hélices puissent s'insérer et se positionner dans la membrane mitochondriale de façon à induire la formation de pores. La seconde explication concernant le rôle du domaine C-terminal de Bak pourrait être son implication dans l'interaction avec la metaxine 1, le partenaire de Bak activé, expliquant ainsi le différentiel d'association entre le $Bak^{\Delta C}$ non traité et le $Bak^{\Delta C}$ traité par tBid.

Enfin pour ce qui est de l'adressage même de Bak à la mitochondrie, ces résultats montrent que le domaine N-terminal et l'Hα1 ne sont pas impliqués contrairement à son homologue Bax. Il semble plus probable que cet adressage soit médié par le C-terminal comme le suggère fortement l'étude realisée sur celui-ci par Martinez-Senac *et al.*. En outre les résultats des tests acellulaires montrent que la délétion de ce domaine entraîne un changement au niveau de l'association mitochondriale de Bak même si ce dernier est tout de même retrouvé sur la membrane. Tout ceci semble donc indiquer que la séquence d'adressage de Bak pourrait se situer au niveau de l'extrémité C-terminale comme c'est le cas pour Bcl-2 et Bcl-x_L. La raison pour laquelle notre $Bak^{\Delta C}$ serait s'associerait tout de même à la mitochondrie pourrait résulter du fait que la délétion du seul domaine transmembranaire n'élimine pas totalement la séquence d'adressage, il a en effet été démontré que les séquences responsable de l'adressage de Bcl-2 et Bcl-x_L sont constituées par leur domaine transmembranaire mais également par d'autres résidus situés de chaque côté de ce domaine. Le domaine BH1 pourrait être impliqué également mais cela semble peu probable à la vue des données connues pour les autres membres de la famille de Bcl-2.

Globalement ces premiers résultats ont permis d'identifier deux nouveaux partenaires protéiques de Bak, les metaxines 1 et 2. Une des informations essentielle est que l'une de ces protéines, la metaxine 2, interagit avec un Bak non activé tandis que la seconde, la metaxine 1, interagit avec un Bak actif. En outre l'existence du complexe Bak/VDAC2 est confirmée dans un autre modèle que le modèle murin dans lequel il a été initialement décrit. Un autre point important est que Bak, comme Bax, utilise des protéines appartenant à la machinerie d'importation de la membrane externe, cependant l'homologie entre les deux protéines pro-apoptotique s'arrête là puisque ils n'utilisent pas les mêmes récepteurs mitochondriaux qui eux se localisent dans des complexes différents. Un autre point de divergence concerne l'adressage mitochondrial de ces protéines qui implique l'intervention du domaine N-terminal et l'Hα1 dans le cas de Bax alors que pour Bak cela semblerait mettre en jeu son domaine transmembranaire C-terminal. En outre alors que Bax et Bcl-2 sont adressés à la mitochondrie par l'intermédiaire de composants du complexe TOM, voie classique utilisée par les protéines à localisation mitochondriale, il apparaît que Bak est adressé de manière peu conventionnelle via son interaction avec les metaxines. Ceci permet de dire que les différences observées entre les partenaires mitochondriaux respectifs de Bax et de Bak apportent encore plus de poids à l'idée de non redondance de leurs activités pro-apoptotiques respectives. Dans la mesure où il a été observé que l'interaction entre Bax et Tom22 est essentielle pour la fonction de Bax, il est à présent essentiel de rechercher l'impact que l'interaction de Bak avec les metaxines peut avoir au niveau de sa fonction pro-apoptotique.

C. Implications fonctionnelles de l'interaction de Bak avec les metaxines

1. Mise en évidence du rôle des metaxines dans l'association mitochondriale de Bak dans des modèles cellulaires

Le premier modèle cellulaire choisi pour valider ces résultats est un modèle de cellules de glioblastome multiforme déficentes en Bax au sein desquelles il a été montré que le processus apoptotique était médié par Bak (**Cartron *et al*., 2003a**). Afin de mettre en évidence le système d'interaction de Bak avec les metaxines dans un système cellulaire et son implication fonctionnelle dans l'apoptose Bak-dépendante, l'expression de la metaxine 1 (GBM AS-Mtx1) ou de la metaxine 2 (GBM AS-Mtx2) a été éteinte dans ces cellules par expression d'une séquence full length antisens du messager de ces protéines a l'image de ce qui a été fait pour Tom22, le récepteur de Bax. L'expression de ces antisens permet d'obtenir une extinction totale de ces protéines (figure 4A). Bien qu'initialement le metaxine 2 ait été décrite comme une protéine périphérique partenaire dela metaxine 1, il faut noter ici qu'elle semble posséder d'autres partenaires puisque comme le montre la figure 4A, dans les GBM AS-Mtx1 la metaxine 2 reste mitochondriale en absence de metaxine 1 et seul un traitement alcalin permet de la dissocier de la membrane mitochondriale. Ceci suggère donc l'existence d'autres protéines liées au couple metaxine 1 et metaxine 2, faisant de celles-ci des composants d'un plus vaste complexe. Comme il est décrit dans l'introduction parmi les candidats possibles, le Sam50 humain semble être le meilleur puisqu'avec les metaxines il constituerait le complexe SAM humain.

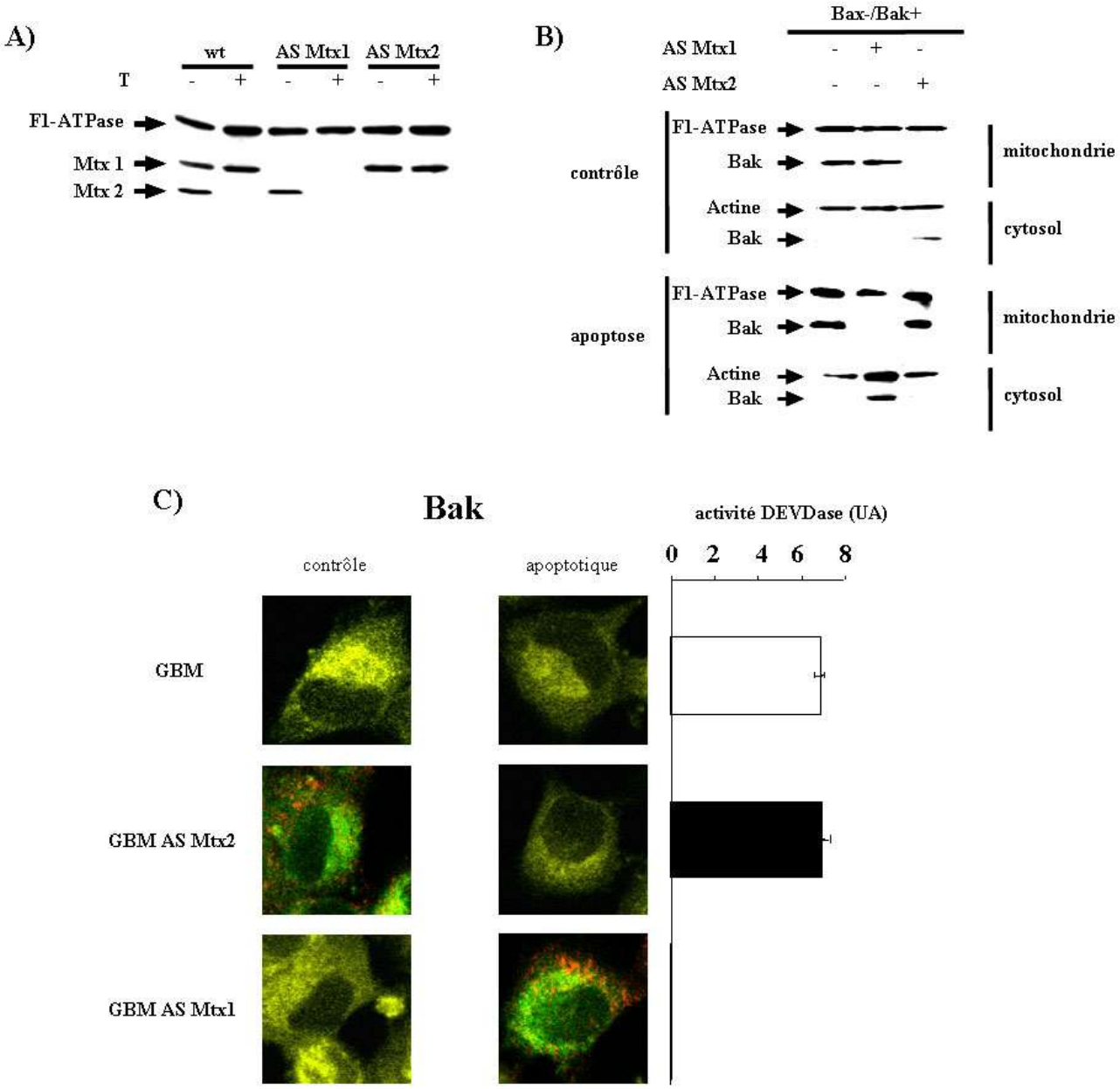


Figure 4: Eutde fonctionnelle de l'interaction de Bak avec les metaxines dans les modèles GBM AS-Mtx2 et GBM AS-Mtx1. A) Analyse par western blot de l'expression metaxines 1 et 2 dans des fractions mitochondriales de GBM (wt), de GBM AS-Mtx1 (AS Mtx1) ou de GBM AS-Mtx2 (AS Mtx2). Les mitochondries ont subi un traitement alcalin (T) ou non. B) Fractionnement subcellulaire et analyse de la localisation de Bak en conditions normales ou apoptotiques (induction à la staurosporine) dans les différents modèles cellulaires. C) Microscopie confocale réalisée sur les différents modèles cellulaires en conditions normales ou apoptotiques (induction à la staurosporine). Les mitochondries sont marquées en vert et Bak en rouge. L'activité DEVDase a été mesurée également dans les différents modèles cellulaires.

Des expériences de fractionnement subcellulaire sur ces différents modèles exprimant ou non les metaxines en conditions saines ou apoptotiques permettent de valider l'existence et l'importance de l'interaction et ces deux nouveaux partenaires mitochondriaux que sont la metaxine 1 et la metaxine 2 (figure 4B). En effet dans les GBM parentales, on retrouve bien du Bak dans la fraction mitochondriale qu'il y ait eu induction de la mort cellulaire ou non. En revanche la même approche sur les cellules GBM AS-Mtx1 conduit à l'observation que

Bak est bien mitochondrial en conditions non apoptotiques mais qu'il se relocalise au niveau du cytosol lors de l'induction de l'apoptose par un traitement à la staurosporine. Pour ce qui est des GBM AS-Mtx2 c'est en conditions normales que Bak se retrouve dans la fraction cytosolique et lorsque les cellules sont traitées à la staurosporine, Bak se relocalise de façon étonnante au niveau de la mitochondrie. Le marquage intracellulaire de Bak et des mitochondries (figure 4C) confirme bien les résultats de fractionnement subcellulaire puisque dans les GBM AS-Mtx2 non apoptotiques Bak se relocalise dans le cytosol et retrouve une localisation mitochondriale lorsque les cellules sont traitées à la staurosporine. A l'inverse dans les GBM AS-Mtx1 Bak reste mitochondrial dans les non-apoptotiques alors que durant le processus de mort cellulaire il se relocalise vers le cytosol. En outre la mesure de l'activité DEVDase induite lors de l'apoptose de ces différents modèles cellulaires montre que les GBM AS-Mtx2 présentent une activité caspase similaire à celle des GBM parentales alors que les GBM AS-Mtx1 ne montrent aucune activité DEVDase. Ceci est une information importante car cela signifie que la metaxine 1 joue un rôle dans la fonction de Bak semblable à celui que joue Tom22 pour Bax en tant que partenaire essentiel.

Ainsi le couple metaxine 1/metaxine 2 apparaît jouer un rôle important dans la fonction pro-apoptotique de Bak. Un des premiers points observé est que la metaxine 2 semble jouer un rôle primordial dans l'association primaire de Bak avec la mitochondrie. En effet la déplétion en metaxine 2 conduit à la relocalisation massive de Bak vers le cytosol et si une fraction de Bak reste mitochondriale elle semble être très minoritaire à la vue des résultats de fractionnement subcellulaire. Ceci suggère donc que les autres partenaires connus de Bak sur la membrane mitochondriale ne soient pas suffisants pour maintenir sa localisation en absence de metaxine 2. Pourtant les test acellulaires montrent également qu'en bloquant le VDAC2, Bak ne se relocalise plus à la mitochondrie. Ceci peut s'expliquer du fait des conditions acellulaires mais il est aussi possible d'imaginer que les metaxines, Bak et VDAC2 se trouvent au niveau des mêmes sites membranaires, le bloquage induit par l'utilisation d'anticorps anti-VDAC2 pouvant ains être à l'origine d'un bloquage des sites metaxine 2 par un mécanisme de type encombrement stérique. Dans un tel système il peut être envisagé que Bak serait adressé à la mitochondrie via la metaxine 2 qui lui servirait de récepteur sur la membrane externe et, dans la mesure où l'absence de metaxine 2 ne sensibilise pas les cellules à une apoptose Bak-dépendante contrairement à ce qui est décrit pour le VDAC2, ce dernier pourrait alors venir interagir avec Bak et verrouiller ainsi le système, inhibant ainsi l'activité cytotoxique intrinsèque de Bak. Il est possible de penser que Mcl-1 et Bcl-x^L puissent intervenir à ce niveau mais compte tenu des connaissances du mode de fonctionnement des protéines de la famille de Bcl-2 il semble plus vraisemblable que les hétérodimères Mcl-1/Bak et Bcl-x^L/Bak décrits au niveau de la mitochondries soient des entités membranaires indépendantes des interactions entre Bak et la meatxine 2 et le VDAC2. Ces hétérodimères se formeraient donc plutôt en aval de l'adressage de Bak via la metaxine 2 et/ou de son interaction avec le VDAC2. A la suite de l'activation de Bak lors de l'apoptose l'inhibition induite par le VDAC2 est levée ainsi que l'interaction avec la metaxine 2 et dans ce cas la metaxine 1 devient le récepteur de la forme active de Bak. Ceci est observé dans les GBM AS-Mtx2 où le Bak cytosolique redevient mitochondrial et tue la cellule après un stimulus apoptotique, suggérant ainsi que la metaxine 1 est suffisante pour relocaliser une forme de Bak active à la mitochondrie. En outre l'absence de metaxine 1 entraînant un bloquage de l'apoptose induite par Bak, il apparaît que ce récepteur possède un rôle indispensable dans la fonction pro-apoptotique de Bak.

2. Rôle fondamental de la metaxine 1 dans la fonction pro-apoptotique de Bak

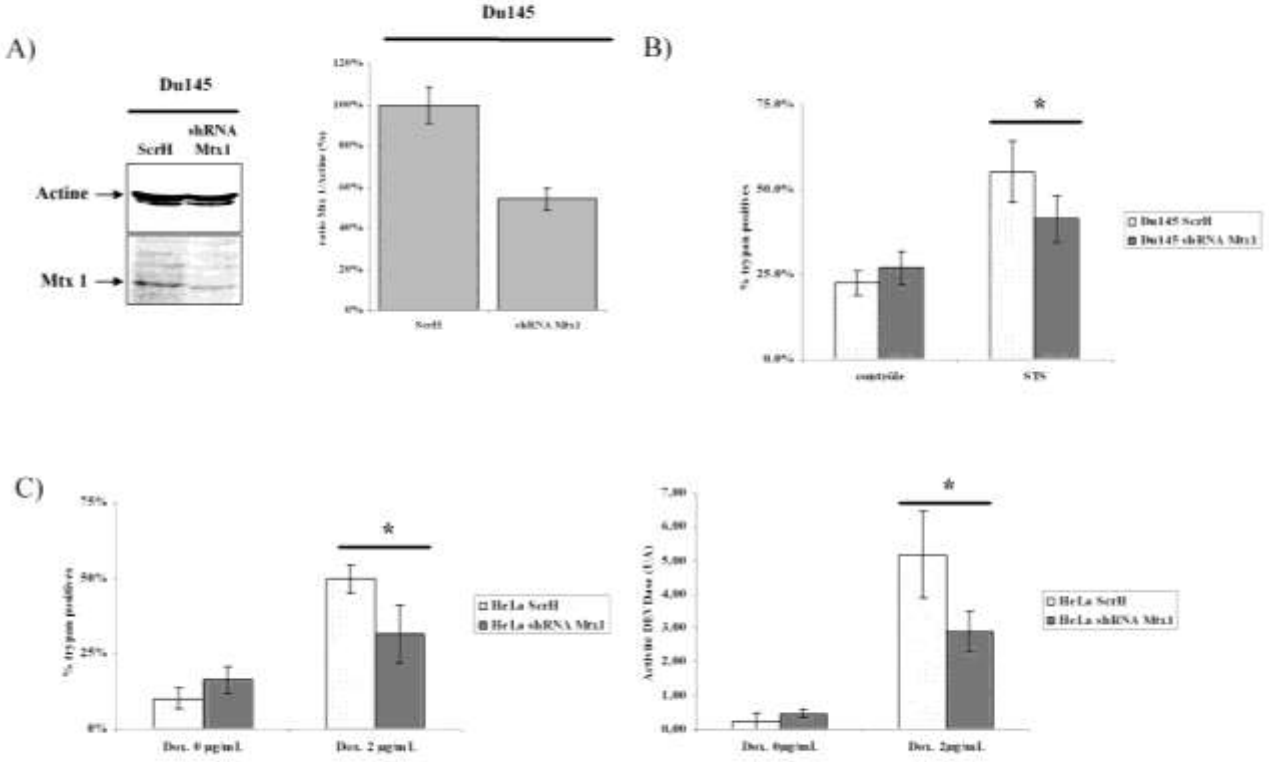


Figure 5: Diminution de l'expression de la metaxine 1 par expression de shRNA dans deux autres modèles cellulaires. A) Analyse par western blot et quantification de l'expression de la metaxine 1 dans les Du145 transfectées avec un shRNA contrôle (Du145 ScrH) et avec un shRNA-metaxine 1 (Du145 shRNA-Mtx1). B) Sensibilité des cellules Du145 ScrH et des Du145 shRNA-Mtx1 à un traitement à la staurosporine (0.5 µM). Les Du145 shRNA-Mtx1 présentent un taux de mortalité moins important que les cellules contrôles ($P<0.05$). C) Implication fonctionnelle de la diminution de l'expression du shRNA-Mtx1 dans un modèle de cellules HeLa traitées ou non à la doxorubicine (2µg/mL). Evaluation de la sensibilité au traitement à la doxorubicine (à gauche) et mesure de l'acitivité caspase induite par le traitement (à droite).

Dans un premier temps, pour examiner que ce rôle de la metaxine 1 n'était pas simplement dû au modèle cellulaire de GBM Bax déficient utilisé, une approche par ARN interférence a été utilisée dans d'autres modèles de cellules et l'impact sur la mort cellulaire après induction apoptotique a été vérifiée. Dans un modèle de Du145, cellules également déficientes en Bax, la diminution de moitié de l'expression de la metaxine 1 (figure 5A) entraîne une diminution significative de la mortalité cellulaire observée après un traitement à la staurosporine (figure 5B). De la même façon la diminution d'expression de la metaxine 1 dans les cellules HeLa, possédant cette fois-ci les deux protéines effectrices pro-apoptotiques Bax et Bak, entraîne les mêmes conséquences. En effet un traitement par un autre stimulus apoptotique, la doxorubicine, de ces cellules HeLa montre qu'une moindre expression de la metaxine 1 induit une mortalité moindre de ces cellules (figure 5C, gauche). De plus cette plus grande résistance est bien liée à une résistance à l'apoptose puisque les cellules HeLa shRNA Mtx1

présente une activité caspase plus faible que les cellules contrôles HeLa ScrH après traitement à la doxorubicine (figure 5C, droite). Ainsi il y a bien confirmation d'un rôle de la metaxine 1 dans le processus apoptotique qui peut donc être généralisé à plusieurs modèles cellulaires. L'implication de la metaxine 1 dans le processus de mort cellulaire a en fait déjà été observée dans un travail antérieur. En effet en générant des lignées résistantes à la mort induite par le TNFα, un groupe a pu mettre en évidence qu'une des lignées résistantes correspondait à une lignée dont le gène codant pour la metaxine 1 était disrupté (**Wang** *et al.***, 2001**). En outre la localisation mitochondriale de la metaxine est essentielle pour son rôle dans la mort cellulaire. En effet il avait déjà été observé que l'utilisation d'une forme de la metaxine 1 délétée de ces domaines transmembranaire et C-terminal (Mtx1 ΔTm/C), ne pouvant plus se localiser à la mitochondrie, perturbait ainsi complètement son rôle dans l'importation des protéines (**Armstrong** *et al.***, 1997**). Dans la mort induite par le TNFα, la surexpression de la Mtx1 ΔTm/C résulte en un effet dominant négatif puisqu'elle confère la même résistance au TNFα que celle observée lors de la disruption du gène de la metaxine 1.

Donc dans un second, afin de confirmer le rôle de la metaxine 1 dans l'apoptose induite par Bak, le dominant négatif a été surexprimé dans les cellules de glioblastome déficientes en Bax (GBM Mtx1 ΔTm/C) et la sensibilité à l'apoptose induite par la staurosporine a ensuite été évalué (figure 6). Comme l'on s'y attendait les GBM Mtx1 ΔTm/C présentent une mortalité peu importante suite au traitemment par la staurosporine, aussi faible qu'en absence de traitament (figure 6A). En outre la mesure de l'activité caspase induite après cette induction apoptotiques révèle que la surexpression de la Mtx1 ΔTm/C entraîne un bloquage complet de la cascade d'activation des caspases (figure 6B). Ainsi la surexpression du dominant négatif de la metaxine 1 dans ces cellules déficientes en Bax conduit à une résistance totale de ces cellules à l'apoptose, résistance équivalente à celle observé dans des cellules doubles déficentes en Bax et Bak. La metaxine 1 est donc bien un élément essentiel de la mort Bak-dépendante.

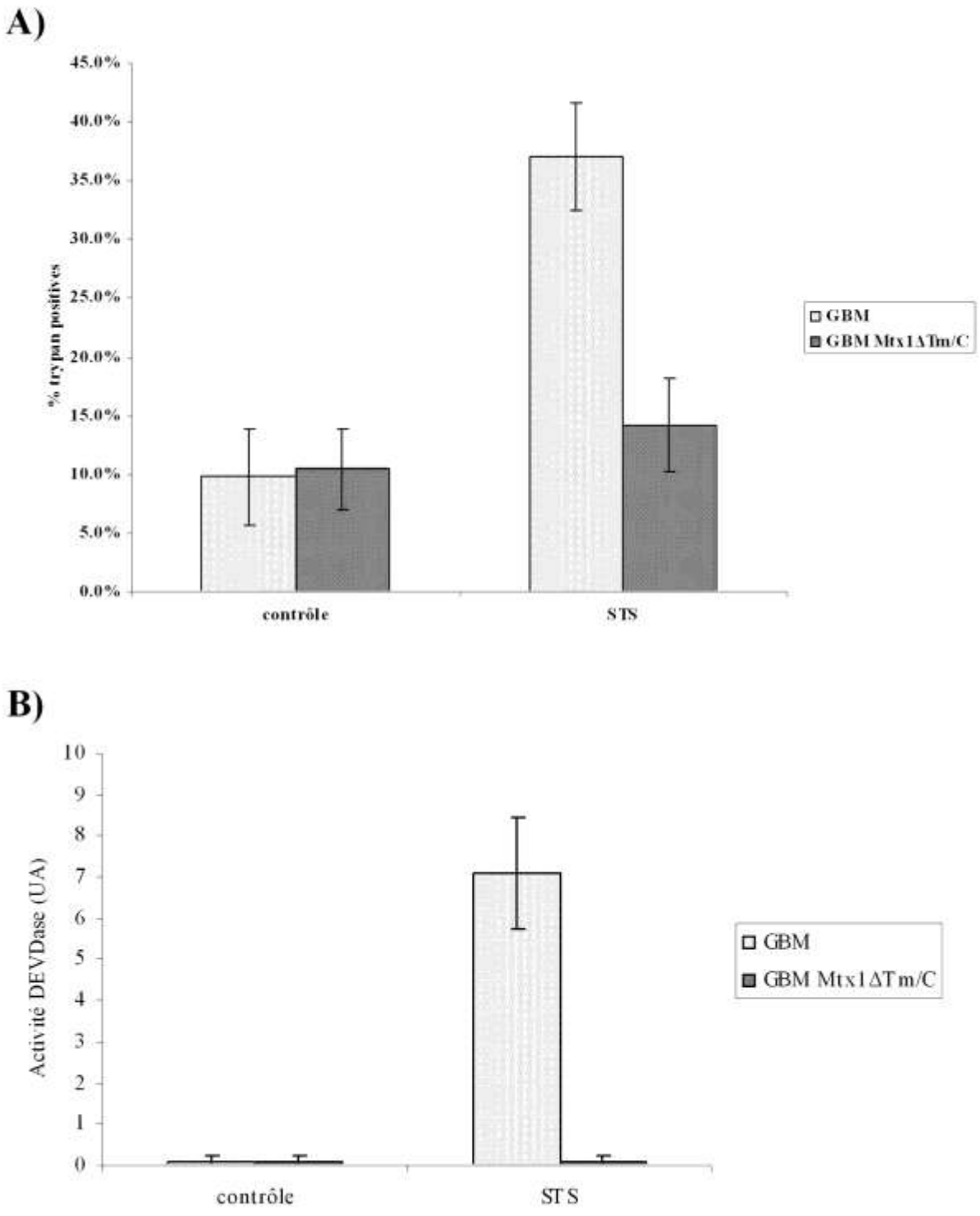


Figure 6: Effet de la surexpression de la Mtx1ΔTm/C dans des cellules de glioblastomes déficientes en Bax. A) Pourcentage de cellules mortes après traitement des GBM ou des GBM MtxΔTm/C à la staurosporine. B) Mesure de l'activité DEVDase générée au sein de ces mêmes cellules après induction par la staurosporine.

Enfin afin de bien s'assurer du rôle direct que joue la metaxine 1 sur la fonction de bak, des tests acellulaires ont été réalisés en utilisant du Bak radiomarqué activé ou non en compétition avec des quantités croissantes de Mtx1ΔTm/C (figure 7). Ainsi un Bak non activé au préalable reste capable de s'associer indépendemment de la dose de Mtx1ΔTm/C et la quantité de Bak associé à la mitochondrie reste inchangée (figure 7A et 7B). En outre un traitement alcalin montre que le niveau d'insertion de Bak ne varie pas non plus comme le montrent la révélation autoradiographique ainsi que la quantification de Bak dans les différentes conditions (figure 7A et 7B). Ainsi le dominant négatif n'a aucun effet sur l'association et l'insertion mitochondriales d'un Bak non-actif. En revanche lorsque Bak est activé au préalable par du p15tBid son niveau d'association et par conséquence son niveau d'insertion sont largement réduits par la Mtx1ΔTm/C (figure 7A et 7B). On peut noter toutefois en voyant les gels (figure 7A) que la forme tronquée de la metaxine 1, bien que ne possédant plus le domaine permettant son insertion mitochondriale, reste capable de s'associer à la mitochondrie et cette association est logiquement presque complètement éliminer lors d'un traitement alcalin. Ceci suggère donc l'existence d'autres partenaires protéiques interagissant probablement avec la partie cytosolique de la metaxine 1. En effet la metaxine 2 étant une protéine périphérique interagissant avec la metaxine 1 cela n'explique pas de façon satisfaisante l'association de Mtx1ΔTm/C avec la mitochondrie. En outre nous avons pu observer que dans les cellules n'ayant pas de metaxine 1, la metaxine 2 reste localisé à la mitochondrie. On peut donc en conclure que les metaxines sont vraissemblablement des composants d'un plus vaste complexe comprenant par exemple la protéine Sam50 dont nous avons parlé dans l'introduction. A ceci l'on peut rajouter que la capacité des surnageants des tests acellulaires réalisés avec du Bak activé par p15tBid à induire l'activation des caspases issues d'un cytosol de cellules non-apoptotiques est diminué fortement en présence de concentrations croissantes du dominant négatif (figure 7C) ce quis'accorde bien avec le phénotype de résistance observé dans les GBM Mtx1ΔTm/C. Afin de généraliser le mécanisme observé lors de cette compétition entre le Bak actif et la Mtx1ΔTm/C, un autre type d'activation de Bak a été réalisé: une activation de Bak par la chaleur (43 °C) avant de l'incuber avec les mitochondries isolées. Dans ce cas encore la compétition générée par l'ajout du dominant négatif permet de diminuer le niveau d'association de Bak à la mitochondrie (figure 7D). L'ensemble de ces résultats confirment ainsi l'idée que le rôle de la metaxine 1 se comporte réellement en tant que pivot du mécanisme de mort induit par Bak. La metaxine 1 est donc un point de régulation fondamental du mécanisme apoptotique dépendant de Bak et joue ainsi un rôle primordial dans l'insertion membranaire de celui-ci dans sa conformation apoptotique induisant la perméabilisation mitochondriale.

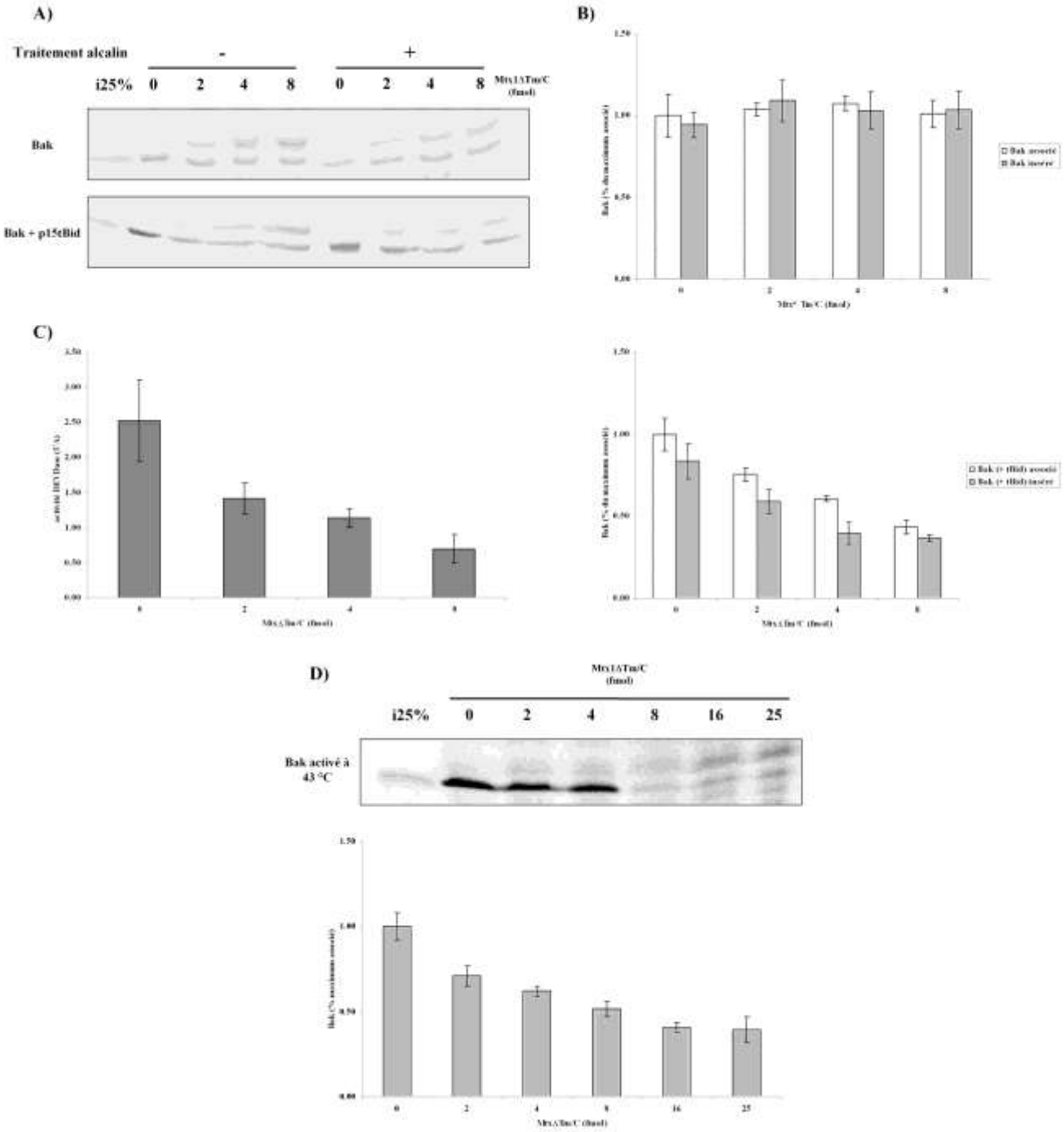


Figure 7: Effet de la compétition induite par ajout de Mtx1 ΔTm/C sur l'association de Bak activé ou non. A) Niveau d'association et d'insertion (traitement alcalin) de Bak ou de Bak activé par p15tBid en fonction des quantités croissantes de Mtx1 ΔTm/C ajoutées. B) Quantification du Bak mitochondrial associé et inséré à partir des autoradiographies comme celles observées en A. C) Activité DEVDase induite par l'ajout des surnageants des tests acellulaires à des cytosols issus de cellules normales. D) Effet de quantités croissantes de Mtx1 ΔTm/C sur l'association de Bak activé par la chaleur.

D. Mise en évidence des complexes mitochondriaux contenant Bak et les Metaxines

La dernière étape de ce travail sur Bak est une observation des complexes mitochondriaux contenant Bak et ceux contenant les metaxines ainsi que l'évolution de ces complexes lorsque le processus apoptotique est induit. Cette analyse a été réalisée par gel 2D sur des échantillons de mitochondries de cellules HeLa traitées ou non à la staurosporine.

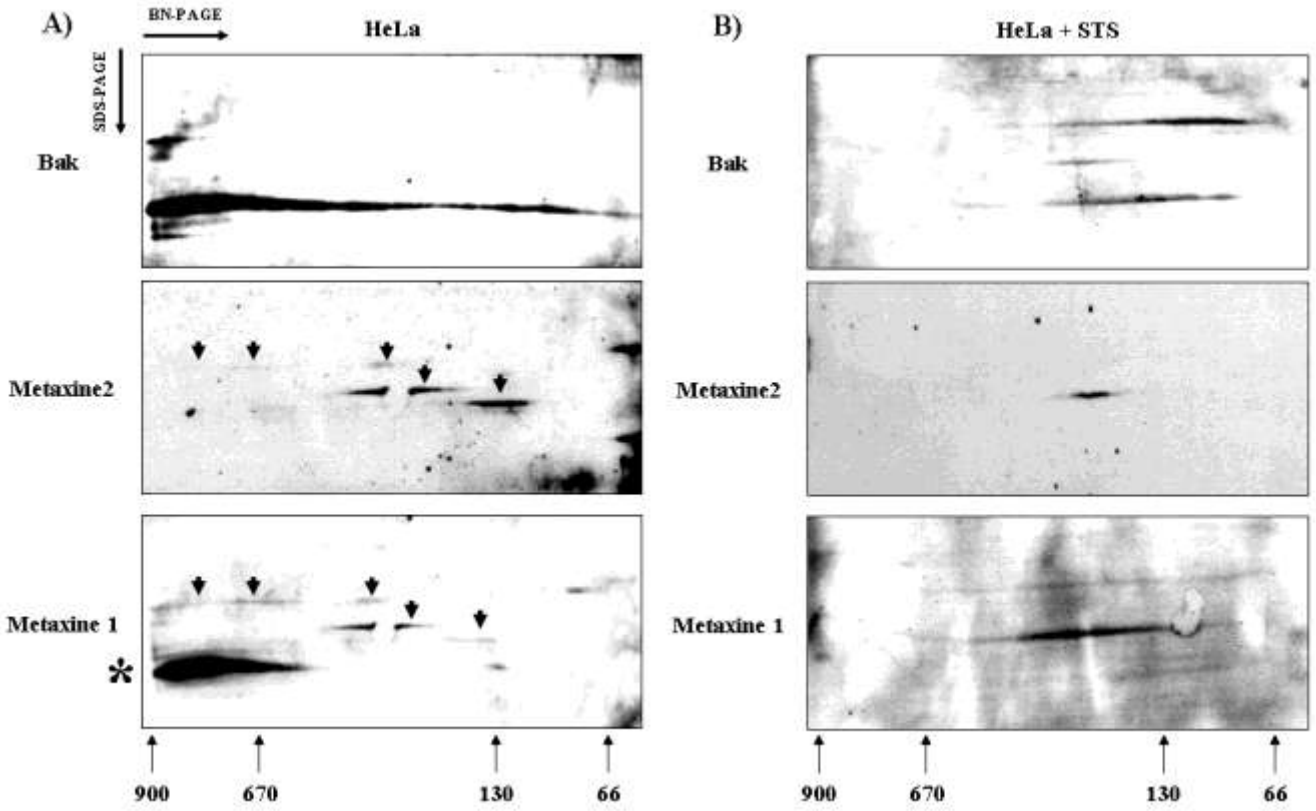


Figure 8: Analyse par gels 2D des complexes mitochondriaux contenant Bax et les metaxines en conditions contrôles ou apoptotiques. A) Analyse réalisée sur des mitochondries de cellules HeLa en conditions contrôles. Les flèches indiquent les signaux correspondant à la metaxine 2 ou à la metaxine 1. Les deux types de tailles observées pour chacune des metaxines peuvent correspondre à la protéine monomérique et à la protéine associée à la seconde metaxine, résultat d'une dénaturation non optimale. L'astérisque correspond à un signal de Bak n'ayant pas disparu après la déshybridation. B) Analyse réalisée sur des mitochondries de cellules HeLa traitées à la staurosprine. Pour Bak deux tailles différentes sont détectées résultant d'une dénaturation non optimale, ces tailles correspondent au monomère et possiblement à un dimère de Bak pour la bande la plus haute. Le même type de signal est obtenu pour la metaxine 1.

L'analyse réalisée ci-dessus montre qu'en condition non apoptotique Bak se trouve au sein d'une vaste gamme de complexes dont la taille varie de 70 à 900 kDa (figure 8A) comme il déjà été démontré par ailleurs (**Mikhailov *et al.*, 2003**) (**Chandra *et al.*, 2005**). Dans ces conditions l'analyse des metaxines révèle que ces protéines se distribuent également au sein d'une gamme de complexes dont la taille varie de 130 à 900 kDa. La distribution des metaxines est strictement identique montant ainsi que ces protéines interagissant l'une avec l'autre sont retrouvées dans les mêmes complexes. Comme nous l'avons dit précédemment lors de l'apoptose Bak se redistribue sous forme de plus petits complexes et plus précisément Bak semble converger vers un type

de complexe de 150 à 250 kDa (**Chandra *et al*., 2005**). De façon intéressante c'est dans ce type de complexe que la protéine VDAC2 se localise. Ici, à la suite d'un traitement la staurosporine, Bak se redistribue au sein de plus petits complexes allant d'environ 100 à 250/300 kDa ce qui est donc bien en accord avec les observations existantes. En outre lorsque l'on observe les metaxines il apparaît que ces dernières subissent le même type de réarrangement que Bak et convergent vers ce type de complexe de taille d'environ 100 à 300 kDa. Ainsi ces résultats montrent que les complexes contenant Bak et les metaxines 1 et 2, similaires en taille en conditions contrôles, subissent le même type de redistribution lors du processus apoptotiques en convergeant vers un type de complexe particulier associé au rôle pro-apoptotique de Bak. Ceci conforte les résultats obtenus précédemment concluant à l'existence d'un complexe entre Bak et les metaxines et au rôle fondamental que jouent les metaxines, surtout la metaxine 1, dans la fonction apoptotique de Bak.

E. Modèle du mécanisme des interactions Bak/metaxines 1 et 2

Ce travail sur la protéine Bak a donc permis de mettre en évidence deux nouveaux partenaires protéiques de la membrane externe mitochondriale interagissant avec la protéine Bak: les metaxines 1 et 2. Le modèle décrit par ces résultats indique que Bak interagit avec la metaxine 2 dans des conditions non apoptotiques. Lors de l'induction de l'apoptose et suite à l'activation de Bak, l'association Bak/metaxine 2 est disruptée et Bak interagit alors avec la metaxine 1 dont le rôle est indispensable à l'insertion membranaire du Bak activé et donc à son activité pro-apoptotique (figure 9A). Parallèlement à ce mécanisme les complexes contenant Bak et les metaxines 1 et 2 subissent un réarrangement moléculaire convergeant vers la formation d'un complexe de 150/300 kDa dont la présence est associée à l'activité pro-apoptotique de Bak et où l'on peut s'attendre à trouver des oligomères de Bak.

A partir de ce modèle il peut être envisagé un second modèle où apparaît l'association de Bak avec d'autres protéines de la membrane externe, notamment le VDAC2 qui réprime la fonction de Bak. Ce modèle peut être imaginé dans la mesure où les résultats énoncés ci-dessus montrent que l'interaction de Bak avec la metaxine 1 est obligatoire pour qu'un mécanisme d'apoptose médiée par Bak puisse avoir lieu. Dans ce modèle l'association Bak/metaxine 2 serait verouillée par l'interaction entre Bak et la protéine VDAC2. Lors de l'activation de Bak conduisant à la disruption du complexe Bak/VDAC2, Bak devient alors libre d'interagir avec la metaxine 1 ce qui permet son insertion puis son oligomérisation dans la membrane externe. Il est possible également d'étendre ce modèle et de remplacer le VDAC2 par les autres partenaires connus de Bak comme Bcl-x_L et Mcl-1.

Un troisème modèle plus complexe peut également être imaginé en tenant compte du fait que les metaxines semblent appartenir au complexe SAM de mammifère et devraient donc se trouver dans un complexe contenant également la protéine Sam50. Sam50 forme une large structure qui pourrait fonctionner comme une cage permettant l'insertion des précurseurs à structure en tonneau β. Dans ce modèle Bak subirait les mêmes variations que dans les modèles précédents en interagissant successivement avec la metaxine 2 en condition normale puis avec la metaxine 1 lors de son activation. La différence pourrait être que Bak pourrait être pris en charge par la protéine Sam50 pour la formation du pore induit par Bak (figure 9C). Ce modèle pourrait également se rapprocher du modèle du MAC. En effet à ce jour il n'a pas été démontré formellement que le MAC pouvait exister dans un modèle ou seule la protéine pro-apoptotique Bak est absente et la seule absence de Bax

(utilisation de cellules Bax KO) ne prévient pas l'apparition du MAC. En outre la découverte de Sam50 et des structures qu'il forme spontanément dans des membranes artificielles montre que cette protéine s'assemble sous la forme d'une large structure en anneau ayant un diamètre externe de 15 nm et un diamètre interne de 7 à 8 nm (**Paschen** *et al.*, **2003**). En outre cet assemblage de Sam50 présente dans ces conditions une activité électrophysiologique similaire à celle décrite pour le MAC. Dans ce modèle il est donc possible d'imaginer que Bak pourrait moduler d'une façon ou d'une autre la structure de l'anneau formé par l'assemblage de Sam50 créant ainsi un nouveau pore de très large conductance dans la membrane externe mitochondriale qui pourrait alors se révéler être le MAC.

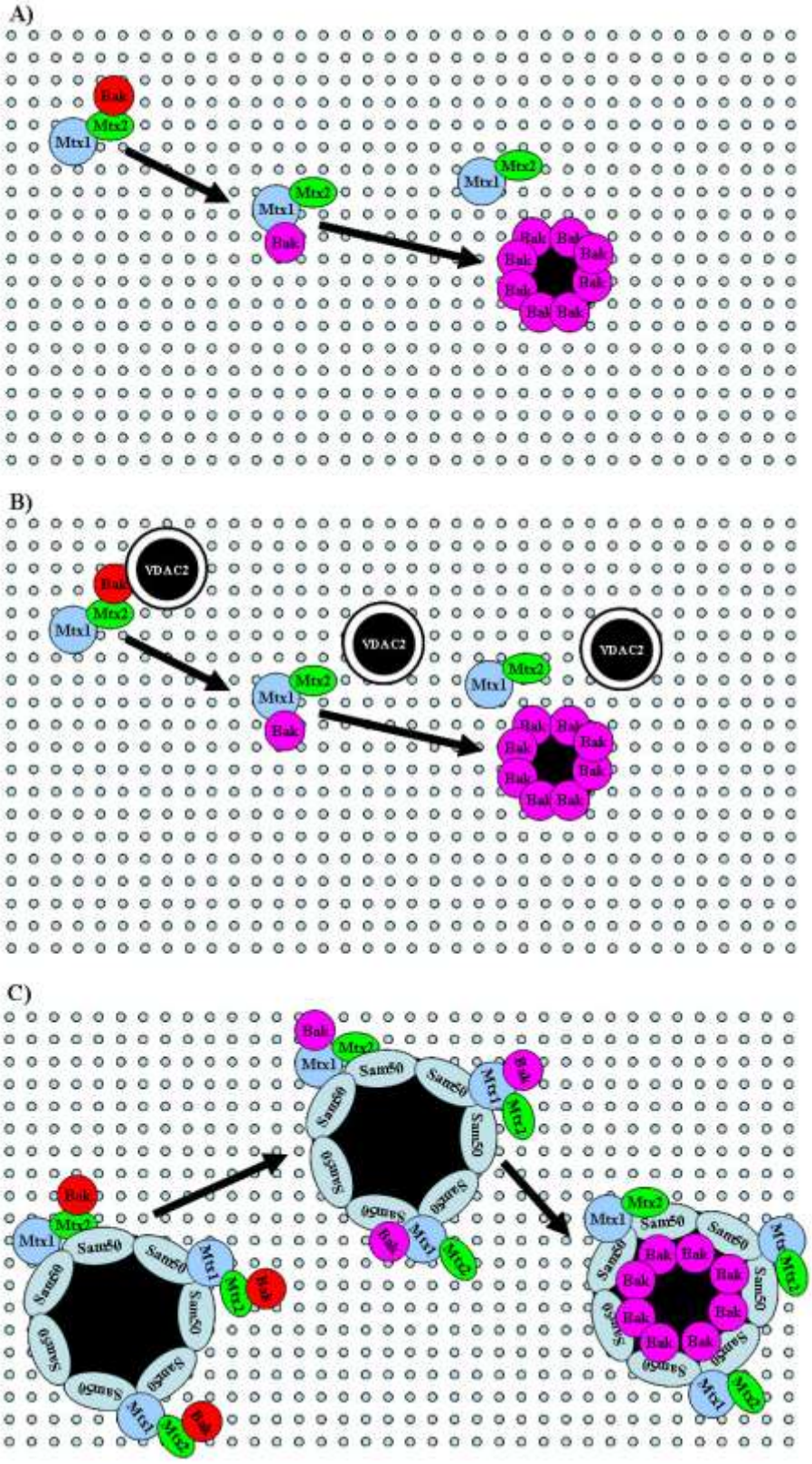


Figure 9: Modèles du mécanisme de perméabilisation induit par Bak. A) Modèle découlant des résultats décrits dans le chapitre III. B) Modèle du verrouillage de l'association Bak/metaxine 2 par le VDAC2. Ce modèle peut s'étendre à des prtéines telles que Bcl-x_L et Mcl-1 qui interagissent avec Bak. C) Modèle incluant le rôle du Sam50 dans la perméabilisation dépendante de Bak. Ce modèle peut également refléter une modulation de la structure formée par Sam50 aboutissant à une activité de type MAC.

CONCLUSION

Les résultats décrits dans le travail qui a été présenté dans ce manuscrit apportent des informations essentielles quand au mode de perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie par les protéines Bax et Bak au cours de l'apoptose. L'un des points importants est que ces deux protéines nécessitent l'interaction avec des protéines appartenant à la machinerie

d'importation des protéines de la membrane externe: Tom22 pour Bax et le couple des metaxines 1 et 2 pour Bak. La différence de partenaires mitochondriaux ajoute encore un peu plus à l'idée de non redondance des fonctions de Bax et de Bak. Les interactions de Bax et de Bak respectivement avec Tom22 et la metaxine 1 sont de plus essentielles pour la fonction apoptotique de ces protéines. Il apparaît donc que ces interactions constituent un point de régulation majeur des deux protéines pro-apoptotiques effectrices de la famille de Bcl-2. Ceci constitue donc une nouvelle voie de réguation de ces protéines qui peut être étendue à d'autres membres de la famille de Bcl-2. En effet comme nous l'avons déjà dit auparavant il est connu que la protéine Bcl-2 interagit avec le récepteur Tom20 du complexe TOM. En outre, très récemment, il a été démontré que la protéine Mcl-1 interagissait avec un autre récepteur du complexe TOM: la protéine Tom70 (**Chou *et al.*, 2006**). Ainsi c'est bien une nouvelle voie de régulation de l'ensemble des protéines de la famille de Bcl-2 par les protéines de la machinerie d'importation protéique de la membrane externe qui semble voir le jour. Le contrôle exercé par ces protéines semblerait se faire au niveau de l'insertion des protéines de la famille de Bcl-2 dans la membrane puisqu'en absence de ces protéines impliquées dans l'import l'insertion membranaire des protéines régulant la perméabilité mitochondriale ne se fait plus, au moins dans les cas de Bax et de Bak. Pour Bak la différence est qu'il n'est pas lié au complexe TOM mais au complexe SAM, un fait intéressant puisqu'il se trouve proche physiquement d'une structure formée par la protéine Sam50 qui potentiellement peut représenter un pore membranaire de très grande taille.

La famille des protéines impliquées dans la machinerie d'importation de la membrane externe semble être une seconde famille de protéines mitochondriales jouant un rôle dans la régulation de l'activité des protéines de la famille de Bcl-2. En effet comme nous l'avons vus en introduction une autre famille de protéines semblant réguler la fonction des protéines de la famille de Bcl-2 correspond aux protéines contrôlant la morphologie mitochondriale. Cependant dans ce second cas, des protéines comme Bax, Bak, Bcl-x_L, Bcl-2 ou Bid semblent intervenir aussi dans la régulation de la fonction des protéines régulant la morphologie de la mitochondrie.

Un dernier fait qui est frappant est l'homologie de fonction des protéines Bax et Bak, en plus d'une homologie structurale, avec le mode d'action des toxines bactériennes de type colicines. La ressemblance est impressionnante surtout lorsque l'on observe la protéine Bax. En effet ces toxines et Bax sont caractérisées par un domaine de formation du pore ainsi qu'un domaine d'interaction avec une protéine membranaire. Ces protéines peuvent être activées par des stimuli semblables induisant leur relocalisation membranaire, leur insertion, leur homo-oligomérisation et la formation d'un pore. Il est donc possible de penser que le système de régulation de l'apoptose par les protéines de la famille de Bcl-2 est le résultat de l'évolution d'un système initial issue de l'endosymbiose primitive entre la cellule eucaryote et une archaebactérie et adapté par les cellules eucaryotes enfin d'en faire un système de mort finement contrôlé.

Finalement ce travail montre que la fonction des protéines Bax et Bak, et à priori celle des autres membres de cette famille de protéine, est étroitement contrôlée par des protéines de la machinerie d'import de la membrane externe. Ce nouveau type de régulation montre à quel point le mécanisme de perméabilisation mitochondriale induite lors de l'apoptose est complexe et que bons nombres de points concernant ce processus restent encore à éclaircir.

BIBLIOGRAPHIE

Abdul, K. M., Terada, K., Yano, M., Ryan, M. T., Streimann, I., Hoogenraad, N. J. & Mori, M. (2000). Functional analysis of human metaxin in mitochondrial protein import in cultured cells and its relationship with the Tom complex. *Biochem Biophys Res Commun*, *276*, pp. 1028-1034.

Abe, Y., Shodai, T., Muto, T., Mihara, K., Torii, H., Nishikawa, S., Endo, T. & Kohda, D. (2000). Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20. *Cell*, *100*, pp. 551-560.

Ahting, U., Thieffry, M., Engelhardt, H., Hegerl, R., Neupert, W. & Nussberger, S. (2001). Tom40, the pore-forming component of the protein-conducting TOM channel in the outer membrane of mitochondria. *J Cell Biol*, *153*, pp. 1151-1160.

Alconada, A., Kubrich, M., Moczko, M., Honlinger, A. & Pfanner, N. (1995). The mitochondrial receptor complex: the small subunit Mom8b/Isp6 supports association of receptors with the general insertion pore and transfer of preproteins. *Mol Cell Biol*, *15*, pp. 6196-6205.

Altieri, D. C. (2001). Cytokinesis, apoptosis and survivin: three for tango?. *Cell Death Differ*, *8*, pp. 4-5.

Alto, N. M., Soderling, J. & Scott, J.D. (2002). Rab32 is an A-kinase anchoring protein and participates in mitochondrial dynamics. *J Cell Biol*, *158*, pp. 659-668.

Antonsson, B. (2004). Mitochondria and the Bcl-2 family proteins in apoptosis signaling pathways. *Mol Cell Biochem*, *256-257*, pp. 141-155.

Antonsson, B., Conti, F., Ciavatta, A., Montessuit, S., Lewis, S., Martinou, I., Bernasconi, L., Bernard, A., Mermod, J. J., Mazzei, G., Maundrell, K., Gambale, F., Sadoul, R. & Martinou, J.C. (1997). Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science*, *277*, pp. 370-372.

Antonsson, B., Montessuit, S., Lauper, S., Eskes, R. & 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*, pp. 271-278.

Antonsson, B., Montessuit, S., Sanchez, B. & 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*, pp. 11615-11623.

Aritomi, M., Kunishima, N., Inohara, N., Ishibashi, Y., Ohta, S. & Morikawa, K. (1997). Crystal structure of rat Bcl-xL. Implications for the function of the Bcl-2 protein family. *J Biol Chem*, *272*, pp. 27886-27892.

Armstrong, L. C., Komiya, T., Bergman, B. E., Mihara, K. & Bornstein, P. (1997). Metaxin is a component of a preprotein import complex in the outer membrane of the mammalian mitochondrion. *J Biol Chem*, *272*, pp. 6510-6518.

Armstrong, L. C., Saenz, A. J. & Bornstein, P. (1999). Metaxin 1 interacts with metaxin 2, a novel related protein associated with the mammalian mitochondrial outer membrane. *J Cell Biochem*, *74*, pp. 11-22.

Arnoult, D., Gaume, B., Karbowski, M., Sharpe, J. C., Cecconi, F. & Youle, R.J. (2003). Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *EMBO J*, *22*, pp. 4385-4399.

Arnoult, D., Grodet, A., Lee, Y., Estaquier, J. & Blackstone, C. (2005b). Release of OPA1 during apoptosis participates in the rapid and complete release of cytochrome c and subsequent mitochondrial fragmentation. *J Biol Chem*, *280*, pp. 35742-35750.

Arnoult, D., Rismanchi, N., Grodet, A., Roberts, R. G., Seeburg, D. P., Estaquier, J., Sheng, M. & Blackstone, C. (2005a). Bax/Bak-dependent release of DDP/TIMM8a promotes Drp1-mediated mitochondrial fission and mitoptosis during programmed cell death. *Curr Biol*, *15*, pp. 2112-2118.

Ashkenazi, A. (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer*, *2*, pp. 420-430.

Bantel, H., Sinha, B., Domschke, W., Peters, G., Schulze-Osthoff, K. & Janicke, R.U. (2001). alpha-Toxin is a mediator of Staphylococcus aureus-induced cell death and activates caspases via the intrinsic death pathway independently of death receptor signaling. *J Cell Biol*, *155*, pp. 637-648.

Basanez, G., Nechushtan, A., Drozhinin, O., Chanturiya, A., Choe, E., Tutt, S., Wood, K. A., Hsu, Y., Zimmerberg, J. & 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*, pp. 5492-5497.

Boldogh, I., Vojtov, N., Karmon, S. & Pon, L.A. (1998). Interaction between mitochondria and the actin cytoskeleton in budding yeast requires two integral mitochondrial outer membrane proteins, Mmm1p and Mdm10p. *J Cell Biol*, *141*, pp. 1371-1381.

Bornstein, P., McKinney, C. E., LaMarca, M. E., Winfield, S., Shingu, T., Devarayalu, S., Vos, H. L. & Ginns, E.I. (1995). Metaxin, a gene contiguous to both thrombospondin 3 and glucocerebrosidase, is required for embryonic development in the mouse: implications for Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *92*, pp. 4547-4551.

Bossy-Wetzel, E., Barsoum, M. J., Godzik, A., Schwarzenbacher, R. & Lipton, S.A. (2003). Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging. *Curr Opin Cell Biol*, *15*, pp. 706-716.

Brix, J., Rudiger, S., Bukau, B., Schneider-Mergener, J. & Pfanner, N. (1999). Distribution of binding sequences for the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70 in a presequence-carrying preprotein and a non-cleavable preprotein. *J Biol Chem*, *274*, pp. 16522-16530.

Brustugun, O. T., Fladmark, K. E., Doskeland, S. O., Orrenius, S. & Zhivotovsky, B. (1998). Apoptosis induced by microinjection of cytochrome c is caspase-dependent and is inhibited by Bcl-2. *Cell Death Differ*, *5*, pp. 660-668.

Cartron, P. F., Oliver, L., Mayat, E., Meflah, K. & Vallette, F.M. (2004b). Impact of pH on Bax alpha conformation, oligomerisation and mitochondrial integration. *FEBS Lett*, *578*, pp. 41-46.

Cartron, P., Arokium, H., Oliver, L., Meflah, K., Manon, S. & Vallette, F.M. (2005). Distinct domains control the addressing and the insertion of Bax into mitochondria. *J Biol Chem*, *280*, pp. 10587-10598.

Cartron, P., Gallenne, T., Bougras, G., Gautier, F., Manero, F., Vusio, P., Meflah, K., Vallette, F. M. & Juin, P. (2004c). 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*, pp. 807-818.

Cartron, P., Juin, P., Oliver, L., Martin, S., Meflah, K. & Vallette, F.M. (2003a). Nonredundant role of Bax and Bak in Bid-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol*, *23*, pp. 4701-4712.

Cartron, P., Moreau, C., Oliver, L., Mayat, E., Meflah, K. & Vallette, F.M. (2002). Involvement of the N-terminus of Bax in its intracellular localization and function. *FEBS Lett*, *512*, pp. 95-100.

Cartron, P., Oliver, L., Juin, P., Meflah, K. & Vallette, F.M. (2004a). The p18 truncated form of Bax behaves like a Bcl-2 homology domain 3-only protein. *J Biol Chem*, *279*, pp. 11503-11512.

Cartron, P., Priault, M., Oliver, L., Meflah, K., Manon, S. & Vallette, F.M. (2003b). The N-terminal end of Bax contains a mitochondrial-targeting signal. *J Biol Chem*, *278*, pp. 11633-11641.

Chandra, D., Choy, G., Daniel, P. T. & Tang, D.G. (2005). Bax-dependent regulation of Bak by voltage-dependent anion channel 2. *J Biol Chem*, *280*, pp. 19051-19061.

Chen, H., Chomyn, A. & Chan, D.C. (2005). Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem*, *280*, pp. 26185-26192.

Chen, H., Detmer, S. A., Ewald, A. J., Griffin, E. E., Fraser, S. E. & Chan, D.C. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol*, *160*, pp. 189-200.

Chen, M., He, H., Zhan, S., Krajewski, S., Reed, J. C. & Gottlieb, R.A. (2001). Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion. *J Biol Chem*, *276*, pp. 30724-30728.

Cheng, E. H. Y., Sheiko, T. V., Fisher, J. K., Craigen, W. J. & Korsmeyer, S.J. (2003). VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science*, *301*, pp. 513-517.

Cheng, E. H., Wei, M. C., Weiler, S., Flavell, R. A., Mak, T. W., Lindsten, T. & Korsmeyer, S.J. (2001). BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell*, *8*, pp. 705-711.

Chittenden, T., Flemington, C., Houghton, A. B., Ebb, R. G., Gallo, G. J., Elangovan, B., Chinnadurai, G. & Lutz, R.J. (1995a). A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *EMBO J*, *14*, pp. 5589-5596.

Chittenden, T., Harrington, E. A., O'Connor, R., Flemington, C., Lutz, R. J., Evan, G. I. & Guild, B.C. (1995b). Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature*, *374*, pp. 733-736.

Chou, C., Lee, R. & Yang-Yen, H. (2006). An Internal EELD Domain Facilitates Mitochondrial Targeting of Mcl-1 via a Tom70-dependent Pathway. *Mol Biol Cell*, *17*, pp. 3952-3963.

Chou, J. J., Li, H., Salvesen, G. S., Yuan, J. & Wagner, G. (1999). Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signaling. *Cell*, *96*, pp. 615-624.

Cipolat, S., Martins de Brito, O., Dal Zilio, B. & Scorrano, L. (2004). OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*, pp. 15927-15932.

Cory, S. & Adams, J.M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*, *2*, pp. 647-656.

Curran, S. P., Leuenberger, D., Schmidt, E. & Koehler, C.M. (2002). The role of the Tim8p-Tim13p complex in a conserved import pathway for mitochondrial polytopic inner membrane proteins. *J Cell Biol*, *158*, pp. 1017-1027.

Degenhardt, K., Sundararajan, R., Lindsten, T., Thompson, C. & White, E. (2002). Bax and Bak independently promote cytochrome C release from mitochondria. *J Biol Chem*, *277*, pp. 14127-14134.

Degli Esposti, M., Cristea, I. M., Gaskell, S. J., Nakao, Y. & Dive, C. (2003). Proapoptotic Bid binds to monolysocardiolipin, a new molecular connection between mitochondrial membranes and cell death. *Cell Death Differ*, *10*, pp. 1300-1309.

Degli Esposti, M., Erler, J. T., Hickman, J. A. & Dive, C. (2001). Bid, a widely expressed proapoptotic protein of the Bcl-2 family, displays lipid transfer activity. *Mol Cell Biol*, *21*, pp. 7268-7276.

Dejean, L. M., Martinez-Caballero, S., Guo, L., Hughes, C., Teijido, O., Ducret, T., Ichas, F., Korsmeyer, S. J., Antonsson, B., Jonas, E. A. & Kinnally, K.W. (2005). Oligomeric Bax is a component of the putative cytochrome c release channel MAC, mitochondrial apoptosis-induced channel. *Mol Biol Cell*, *16*, pp. 2424-2432.

Dekker, P. J., Muller, H., Rassow, J. & Pfanner, N. (1996). Characterization of the preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane by blue native electrophoresis. *Biol Chem*, *377*, pp. 535-538.

Dekker, P. J., Ryan, M. T., Brix, J., Muller, H., Honlinger, A. & Pfanner, N. (1998). Preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane: molecular dissection and assembly of the general import pore complex. *Mol Cell Biol*, *18*, pp. 6515-6524.

Delivani, P., Adrain, C., Taylor, R. C., Duriez, P. J. & Martin, S.J. (2006). Role for CED-9 and Egl-1 as regulators of mitochondrial fission and fusion dynamics. *Mol Cell*, *21*, pp. 761-773.

Desagher, S. & Martinou, J.C. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol*, *10*, pp. 369-377.

Desagher, S., Osen-Sand, A., Nichols, A., Eskes, R., Montessuit, S., Lauper, S., Maundrell, K., Antonsson, B. & Martinou, J.C. (1999). Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol*, *144*, pp. 891-901.

Deveraux, Q. L. & Reed, J.C. (1999). IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev*, *13*, pp. 239-252.

Deveraux, Q. L., Roy, N., Stennicke, H. R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Salvesen, G. S. & Reed, J.C. (1998). IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J*, *17*, pp. 2215-2223.

Diekert, K., de Kroon, A. I., Ahting, U., Niggemeyer, B., Neupert, W., de Kruijff, B. & Lill, R. (2001). Apocytochrome c requires the TOM complex for translocation across the mitochondrial outer membrane. *EMBO J*, *20*, pp. 5626-5635.

Dietmeier, K., Honlinger, A., Bomer, U., Dekker, P. J., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Kubrich, M. & Pfanner, N. (1997). Tom5 functionally links mitochondrial preprotein receptors to the general import pore. *Nature*, *388*, pp. 195-200.

Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. & Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, *102*, pp. 33-42.

Esaki, M., Kanamori, T., Nishikawa, S., Shin, I., Schultz, P. G. & Endo, T. (2003). Tom40 protein import channel binds to non-native proteins and prevents their aggregation. *Nat Struct Biol*, *10*, pp. 988-994.

Esseiva, A. C., Chanez, A., Bochud-Allemann, N., Martinou, J., Hemphill, A. & Schneider, A. (2004). Temporal dissection of Bax-induced events leading to fission of the single mitochondrion in Trypanosoma brucei. *EMBO Rep*, *5*, pp. 268-273.

Eura, Y., Ishihara, N., Yokota, S. & Mihara, K. (2003). Two mitofusin proteins, mammalian homologues of FZO, with distinct functions are both required for mitochondrial fusion. *J Biochem (Tokyo)*, *134*, pp. 333-344.

Farrow, S. N., White, J. H., Martinou, I., Raven, T., Pun, K. T., Grinham, C. J., Martinou, J. C. & Brown, R. (1995). Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K. *Nature*, *374*, pp. 731-733.

Farsad, K., Ringstad, N., Takei, K., Floyd, S. R., Rose, K. & De Camilli, P. (2001). Generation of high curvature membranes mediated by direct endophilin bilayer interactions. *J Cell Biol*, *155*, pp. 193-200.

Frank, S., Gaume, B., Bergmann-Leitner, E. S., Leitner, W. W., Robert, E. G., Catez, F., Smith, C. L. & Youle, R.J. (2001). The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell*, *1*, pp. 515-525.

Frezza, C., Cipolat, S., Martins de Brito, O., Micaroni, M., Beznoussenko, G. V., Rudka, T., Bartoli, D., Polishuck, R. S., Danial, N. N., De Strooper, B. & Scorrano, L. (2006). OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell*, *126*, pp. 177-189.

Fu, J., Jin, Y. & Arend, L.J. (2003). Smac3, a novel Smac/DIABLO splicing variant, attenuates the stability and apoptosis-inhibiting activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein. *J Biol Chem*, *278*, pp. 52660-52672.

Gakh, O., Cavadini, P. & Isaya, G. (2002). Mitochondrial processing peptidases. *Biochim Biophys Acta*, *1592*, pp. 63-77.

Gao, W., Pu, Y., Luo, K. Q. & Chang, D.C. (2001). Temporal relationship between cytochrome c release and mitochondrial swelling during UV-induced apoptosis in living HeLa cells. *J Cell Sci*, *114*, pp. 2855-2862.

Garcia-Saez, A. J., Coraiola, M., Dalla Serra, M., Mingarro, I., Menestrina, G. & Salgado, J. (2005). Peptides derived from apoptotic Bax and Bid reproduce the poration activity of the parent full-length proteins. *Biophys J*, *88*, pp. 3976-3990.

Garcia-Saez, A. J., Coraiola, M., Serra, M. D., Mingarro, I., Muller, P. & Salgado, J. (2006). Peptides corresponding to helices 5 and 6 of Bax can independently form large lipid pores. *FEBS J*, *273*, pp. 971-981.

Garcia-Saez, A. J., Mingarro, I., Perez-Paya, E. & Salgado, J. (2004). Membrane-insertion fragments of Bcl-xL, Bax, and Bid. *Biochemistry*, *43*, pp. 10930-10943.

Genestier, A., Michallet, M., Prevost, G., Bellot, G., Chalabreysse, L., Peyrol, S., Thivolet, F., Etienne, J., Lina, G., Vallette, F. M., Vandenesch, F. & Genestier, L. (2005). Staphylococcus aureus Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. *J Clin Invest*, *115*, pp. 3117-3127.

Germain, M., Mathai, J. P., McBride, H. M. & Shore, G.C. (2005). Endoplasmic reticulum BIK initiates DRP1-regulated remodelling of mitochondrial cristae during apoptosis. *EMBO J*, *24*, pp. 1546-1556.

Goldstein, J. C., Waterhouse, N. J., Juin, P., Evan, G. I. & Green, D.R. (2000). The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol*, *2*, pp. 156-162.

Goping, I. S., Gross, A., Lavoie, J. N., Nguyen, M., Jemmerson, R., Roth, K., Korsmeyer, S. J. & Shore, G.C. (1998). Regulated targeting of BAX to mitochondria. *J Cell Biol*, *143*, pp. 207-215.

Gorsich, S. W. & Shaw, J.M. (2004). Importance of mitochondrial dynamics during meiosis and sporulation. *Mol Biol Cell*, *15*, pp. 4369-4381.

Gratzer, S., Lithgow, T., Bauer, R. E., Lamping, E., Paltauf, F., Kohlwein, S. D., Haucke, V., Junne, T., Schatz, G. & Horst, M. (1995). Mas37p, a novel receptor subunit for protein import into mitochondria. *J Cell Biol*, *129*, pp. 25-34.

Gray, M. W., Burger, G. & Lang, B.F. (1999). Mitochondrial evolution. *Science*, *283*, pp. 1476-1481.

Griffiths, G. J., Corfe, B. M., Savory, P., Leech, S., Esposti, M. D., Hickman, J. A. & Dive, C. (2001). Cellular damage signals promote sequential changes at the N-terminus and BH-1 domain of the pro-apoptotic protein Bak. *Oncogene*, *20*, pp. 7668-7676.

Griffiths, G. J., Dubrez, L., Morgan, C. P., Jones, N. A., Whitehouse, J., Corfe, B. M., Dive, C. & Hickman, J.A. (1999). Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol*, *144*, pp. 903-914.

Grinberg, M., Schwarz, M., Zaltsman, Y., Eini, T., Niv, H., Pietrokovski, S. & Gross, A. (2005). Mitochondrial carrier homolog 2 is a target of tBID in cells signaled to die by tumor necrosis factor alpha. *Mol Cell Biol*, *25*, pp. 4579-4590.

Griparic, L., van der Wel, N. N., Orozco, I. J., Peters, P. J. & van der Bliek, A.M. (2004). Loss of the intermembrane space protein Mgm1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria. *J Biol Chem*, *279*, pp. 18792-18798.

Gross, A., Jockel, J., Wei, M. C. & Korsmeyer, S.J. (1998). Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J*, *17*, pp. 3878-3885.

Guo, L., Pietkiewicz, D., Pavlov, E. V., Grigoriev, S. M., Kasianowicz, J. J., Dejean, L. M., Korsmeyer, S. J., Antonsson, B. & Kinnally, K.W. (2004). Effects of cytochrome c on the mitochondrial apoptosis-induced channel MAC. *Am J Physiol Cell Physiol*, *286*, p. C1109-17.

Hanekamp, T., Thorsness, M. K., Rebbapragada, I., Fisher, E. M., Seebart, C., Darland, M. R., Coxbill, J. A., Updike, D. L. & Thorsness, P.E. (2002). Maintenance of mitochondrial morphology is linked to maintenance of the mitochondrial genome in Saccharomyces cerevisiae. *Genetics*, *162*, pp. 1147-1156.

Harrison, S. C. (1996). Peptide-surface association: the case of PDZ and PTB domains. *Cell*, *86*, pp. 341-343.

Heath-Engel, H. M. & Shore, G.C. (2006). Mitochondrial membrane dynamics, cristae remodelling and apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, *1763*, pp. 549-560.

Hegde, R., Srinivasula, S. M., Zhang, Z., Wassell, R., Mukattash, R., Cilenti, L., DuBois, G., Lazebnik, Y., Zervos, A. S., Fernandes-Alnemri, T. & Alnemri, E.S. (2002). Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem*, *277*, pp. 432-438.

Heimlich, G., McKinnon, A. D., Bernardo, K., Brdiczka, D., Reed, J. C., Kain, R., Kronke, M. & Jurgensmeier, J.M. (2004). Bax-induced cytochrome c release from mitochondria depends on alpha-helices-5 and -6. *Biochem J*, *378*, pp. 247-255.

Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, *407*, pp. 770-776.

Hill, K., Model, K., Ryan, M. T., Dietmeier, K., Martin, F., Wagner, R. & Pfanner, N. (1998). Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins [see comment]. *Nature*, *395*, pp. 516-521.

Hinshaw, J. E. (2000). Dynamin and its role in membrane fission. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *16*, pp. 483-519.

Hockenbery, D., Nunez, G., Milliman, C., Schreiber, R. D. & Korsmeyer, S.J. (1990). Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*, *348*, pp. 334-336.

Holcik, M. & Korneluk, R.G. (2001). XIAP, the guardian angel. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *2*, pp. 550-556.

Hong, S., Cha, M. & Kim, I. (2006). Specific protein interaction of human Pag with Omi/HtrA2 and the activation of the protease activity of Omi/HtrA2. *Free Radic Biol Med*, *40*, pp. 275-284.

Honlinger, A., Bomer, U., Alconada, A., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Dietmeier, K. & Pfanner, N. (1996). Tom7 modulates the dynamics of the mitochondrial outer membrane translocase and plays a pathway-related role in protein import. *EMBO J*, *15*, pp. 2125-2137.

Hoogenraad, N. J., Ward, L. A. & Ryan, M.T. (2002). Import and assembly of proteins into mitochondria of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*, *1592*, pp. 97-105.

Hsu, Y. T. & Youle, R.J. (1997). Nonionic detergents induce dimerization among members of the Bcl-2 family. *J Biol Chem*, *272*, pp. 13829-13834.

Hsu, Y. T. & Youle, R.J. (1998). Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. *J Biol Chem*, *273*, pp. 10777-10783.

Hsu, Y. T., Wolter, K. G. & Youle, R.J. (1997). Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *94*, pp. 3668-3672.

Hu, S. & Yang, X. (2003). Cellular inhibitor of apoptosis 1 and 2 are ubiquitin ligases for the apoptosis inducer Smac/DIABLO. *J Biol Chem*, *278*, pp. 10055-10060.

Huang, D. C. & Strasser, A. (2000). BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell*, *103*, pp. 839-842.

Huang, D. C., Adams, J. M. & Cory, S. (1998). The conserved N-terminal BH4 domain of Bcl-2 homologues is essential for inhibition of apoptosis and interaction with CED-4. *EMBO J*, *17*, pp. 1029-1039.

Huang, Y., Rich, R. L., Myszka, D. G. & Wu, H. (2003). Requirement of both the second and third BIR domains for the relief of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP)-mediated caspase inhibition by Smac. *J Biol Chem*, *278*, pp. 49517-49522.

Humphries, A. D., Streimann, I. C., Stojanovski, D., Johnston, A. J., Yano, M., Hoogenraad, N. J. & Ryan, M.T. (2005). Dissection of the mitochondrial import and assembly pathway for human Tom40. *J Biol Chem*, *280*, pp. 11535-11543.

Ishihara, N., Eura, Y. & Mihara, K. (2004). Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J Cell Sci*, *117*, pp. 6535-6546.

Jagasia, R., Grote, P., Westermann, B. & Conradt, B. (2005). DRP-1-mediated mitochondrial fragmentation during EGL-1-induced cell death in C. elegans. *Nature*, *433*, pp. 754-760.

James, D. I., Parone, P. A., Mattenberger, Y. & Martinou, J. (2003). hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *J Biol Chem*, *278*, pp. 36373-36379.

Janiak, F., Leber, B. & Andrews, D.W. (1994). Assembly of Bcl-2 into microsomal and outer mitochondrial membranes. *J Biol Chem*, *269*, pp. 9842-9849.

Jesenberger, V. & Jentsch, S. (2002). Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *3*, pp. 112-121.

Jiang, X. & Wang, X. (2000). Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J Biol Chem*, *275*, pp. 31199-31203.

John, G. B., Shang, Y., Li, L., Renken, C., Mannella, C. A., Selker, J. M. L., Rangell, L., Bennett, M. J. & Zha, J. (2005). The mitochondrial inner membrane protein mitofilin controls cristae morphology. *Mol Biol Cell*, *16*, pp. 1543-1554.

Juin, P., Cartron, P. F. & Vallette, F.M. (2005). Activation of Bax by BH3 domains during apoptosis: the unfolding of a deadly plot. *Cell Cycle*, *4*, pp. 637-642.

Karbowski, M. & Youle, R.J. (2003). Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ*, *10*, pp. 870-880.

Karbowski, M., Arnoult, D., Chen, H., Chan, D. C., Smith, C. L. & Youle, R.J. (2004b). Quantitation of mitochondrial dynamics by photolabeling of individual organelles shows that mitochondrial fusion is blocked during the Bax activation phase of apoptosis. *J Cell Biol*, *164*, pp. 493-499.

Karbowski, M., Jeong, S. & Youle, R.J. (2004a). Endophilin B1 is required for the maintenance of mitochondrial morphology. *J Cell Biol*, *166*, pp. 1027-1039.

Karbowski, M., Lee, Y., Gaume, B., Jeong, S., Frank, S., Nechushtan, A., Santel, A., Fuller, M., Smith, C. L. & Youle, R.J. (2002). Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. *J Cell Biol*, *159*, pp. 931-938.

Kasof, G. M. & Gomes, B.C. (2001). Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *J Biol Chem*, *276*, pp. 3238-3246.

Kaufmann, T., Schlipf, S., Sanz, J., Neubert, K., Stein, R. & Borner, C. (2003). Characterization of the signal that directs Bcl-x(L), but not Bcl-2, to the mitochondrial outer membrane. *J Cell Biol*, *160*, pp. 53-64.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, *26*, pp. 239-257.

Kiefer, M. C., Brauer, M. J., Powers, V. C., Wu, J. J., Umansky, S. R., Tomei, L. D. & Barr, P.J. (1995). Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. *Nature*, *374*, pp. 736-739.

Kim, P. K., Annis, M. G., Dlugosz, P. J., Leber, B. & Andrews, D.W. (2004). During apoptosis bcl-2 changes membrane topology at both the endoplasmic reticulum and mitochondria. *Mol Cell*, *14*, pp. 523-529.

Klein, J. A., Longo-Guess, C. M., Rossmann, M. P., Seburn, K. L., Hurd, R. E., Frankel, W. N., Bronson, R. T. & Ackerman, S.L. (2002). The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature*, *419*, pp. 367-374.

Kluck, R. M., Bossy-Wetzel, E., Green, D. R. & Newmeyer, D.D. (1997a). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*, *275*, pp. 1132-1136.

Kluck, R. M., Martin, S. J., Hoffman, B. M., Zhou, J. S., Green, D. R. & Newmeyer, D.D. (1997b). Cytochrome c activation of CPP32-like proteolysis plays a critical role in a Xenopus cell-free apoptosis system. *EMBO J*, *16*, pp. 4639-4649.

Knudson, C. M., Tung, K. S., Tourtellotte, W. G., Brown, G. A. & Korsmeyer, S.J. (1995). Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science*, *270*, pp. 96-99.

Koehler, C. M. (2004a). New developments in mitochondrial assembly. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *20*, pp. 309-335.

Koehler, C. M. (2004b). The small Tim proteins and the twin Cx3C motif. *Trends Biochem Sci*, *29*, pp. 1-4.

Koehler, C. M., Leuenberger, D., Merchant, S., Renold, A., Junne, T. & Schatz, G. (1999). Human deafness dystonia syndrome is a mitochondrial disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*, pp. 2141-2146.

Komiya, T., Rospert, S., Koehler, C., Looser, R., Schatz, G. & Mihara, K. (1998). Interaction of mitochondrial targeting signals with acidic receptor domains along the protein import pathway: evidence for the 'acid chain' hypothesis. *EMBO J*, *17*, pp. 3886-3898.

Koonin, E. V. & Aravind, L. (2002). Origin and evolution of eukaryotic apoptosis: the bacterial connection. *Cell Death Differ*, *9*, pp. 394-404.

Korostoff, J., Yamaguchi, N., Miller, M., Kieba, I. & Lally, E.T. (2000). Perturbation of mitochondrial structure and function plays a central role in Actinobacillus actinomycetemcomitans leukotoxin-induced apoptosis. *Microb Pathog*, *29*, pp. 267-278.

Kowaltowski, A. J., Cosso, R. G., Campos, C. B. & Fiskum, G. (2002). Effect of Bcl-2 overexpression on mitochondrial structure and function. *J Biol Chem*, *277*, pp. 42802-42807.

Kozjak, V., Wiedemann, N., Milenkovic, D., Lohaus, C., Meyer, H. E., Guiard, B., Meisinger, C. & Pfanner, N. (2003). An essential role of Sam50 in the protein sorting and assembly machinery of the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem*, *278*, pp. 48520-48523.

Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M. J., Fenton, W. & Reed, J.C. (1993). Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res*, *53*, pp. 4701-4714.

Kun, E., Kirsten, E. & Piper, W.N. (1979). Stabilization of mitochondrial functions with digitonin. *Methods Enzymol*, *55*, pp. 115-118.

Kunkele, K. P., Heins, S., Dembowski, M., Nargang, F. E., Benz, R., Thieffry, M., Walz, J., Lill, R., Nussberger, S. & Neupert, W. (1998). The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria. *Cell*, *93*, pp. 1009-1019.

Kuwana, T. & Newmeyer, D.D. (2003). Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*, *15*, pp. 691-699.

Kuwana, T., Mackey, M. R., Perkins, G., Ellisman, M. H., Latterich, M., Schneiter, R., Green, D. R. & Newmeyer, D.D. (2002). Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell*, *111*, pp. 331-342.

LaMarca, M. E., Goldstein, M., Tayebi, N., Arcos-Burgos, M., Martin, B. M. & Sidransky, E. (2004). A novel alteration in metaxin 1, F202L, is associated with N370S in Gaucher disease. *J Hum Genet*, *49*, pp. 220-222.

Lee, Y., Jeong, S., Karbowski, M., Smith, C. L. & Youle, R.J. (2004). Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol Biol Cell*, *15*, pp. 5001-5011.

Li, H., Zhu, H., Xu, C. J. & Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, *94*, pp. 491-501.

Li, L. Y., Luo, X. & Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, *412*, pp. 95-99.

Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S. & Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, *91*, pp. 479-489.

Li, W., Srinivasula, S. M., Chai, J., Li, P., Wu, J., Zhang, Z., Alnemri, E. S. & Shi, Y. (2002). Structural insights into the pro-apoptotic function of mitochondrial serine protease HtrA2/Omi. *Nat Struct Biol*, *9*, pp. 436-441.

Lim, M. L. R., Chen, B., Beart, P. M. & Nagley, P. (2006). Relative timing of redistribution of cytochrome c and Smac/DIABLO from mitochondria during apoptosis assessed by double immunocytochemistry on mammalian cells. *Exp Cell Res*, *312*, pp. 1174-1184.

Lindsten, T., Ross, A. J., King, A., Zong, W. X., Rathmell, J. C., Shiels, H. A., Ulrich, E., Waymire, K. G., Mahar, P., Frauwirth, K., Chen, Y., Wei, M., Eng, V. M., Adelman, D. M., Simon, M. C., Ma, A., Golden, J. A., Evan, G., Korsmeyer, S. J., MacGregor, G. R. & Thompson, C.B. (2000). The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell*, *6*, pp. 1389-1399.

Lithgow, T., Junne, T., Suda, K., Gratzer, S. & Schatz, G. (1994). The mitochondrial outer membrane protein Mas22p is essential for protein import and viability of yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *91*, pp. 11973-11977.

Lithgow, T., van Driel, R., Bertram, J. F. & Strasser, A. (1994). The protein product of the oncogene bcl-2 is a component of the nuclear envelope, the endoplasmic reticulum, and the outer mitochondrial membrane. *Cell Growth Differ*, *5*, pp. 411-417.

Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R. & Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, *86*, pp. 147-157.

Los, M., Burek, C. J., Stroh, C., Benedyk, K., Hug, H. & Mackiewicz, A. (2003). Anticancer drugs of tomorrow: apoptotic pathways as targets for drug design. *Drug Discov Today*, *8*, pp. 67-77.

Luetjens, C. M., Kogel, D., Reimertz, C., Dussmann, H., Renz, A., Schulze-Osthoff, K., Nieminen, A. L., Poppe, M. & Prehn, J.H. (2001). Multiple kinetics of mitochondrial cytochrome c release in drug-induced apoptosis. *Mol Pharmacol*, *60*, pp. 1008-1019.

Lutter, M., Fang, M., Luo, X., Nishijima, M., Xie, X. & Wang, X. (2000). Cardiolipin provides specificity for targeting of tBid to mitochondria. *Nat Cell Biol*, *2*, pp. 754-761.

Lutter, M., Perkins, G. A. & Wang, X. (2001). The pro-apoptotic Bcl-2 family member tBid localizes to mitochondrial contact sites. *BMC Cell Biol*, *2*, p. 22.

Madesh, M., Antonsson, B., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S. & Hajnoczky, G. (2002). Rapid kinetics of tBid-induced cytochrome c and Smac/DIABLO release and mitochondrial depolarization. *J Biol Chem*, *277*, pp. 5651-5659.

Mancini, M., Anderson, B. O., Caldwell, E., Sedghinasab, M., Paty, P. B. & Hockenbery, D.M. (1997). Mitochondrial proliferation and paradoxical membrane depolarization during terminal differentiation and apoptosis in a human colon carcinoma cell line. *J Cell Biol*, *138*, pp. 449-469.

Mannella, C. A., Pfeiffer, D. R., Bradshaw, P. C., Moraru, I. I., Slepchenko, B., Loew, L. M., Hsieh, C. E., Buttle, K. & Marko, M. (2001). Topology of the mitochondrial inner membrane: dynamics and bioenergetic implications. *IUBMB Life*, *52*, pp. 93-100.

Martinez-Senac, M. D. M., Corbalan-Garcia, S. & Gomez-Fernandez, J.C. (2002). The structure of the C-terminal domain of the pro-apoptotic protein Bak and its interaction with model membranes. *Biophys J*, *82*, pp. 233-243.

Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Jurgensmeier, J. M., Susin, S. A., Vieira, H. L., Prevost, M. C., Xie, Z., Matsuyama, S., Reed, J. C. & Kroemer, G. (1998). Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science*, *281*, pp. 2027-2031.

McDonnell, J. M., Fushman, D., Milliman, C. L., Korsmeyer, S. J. & Cowburn, D. (1999). Solution structure of the proapoptotic molecule BID: a structural basis for apoptotic agonists and antagonists. *Cell*, *96*, pp. 625-634.

McMillin, J. B. & Dowhan, W. (2002). Cardiolipin and apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, *1585*, pp. 97-107.

Meeusen, S., McCaffery, J. M. & Nunnari, J. (2004). Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro. *Science*, *305*, pp. 1747-1752.

Meisinger, C., Rissler, M., Chacinska, A., Szklarz, L. K. S., Milenkovic, D., Kozjak, V., Schonfisch, B., Lohaus, C., Meyer, H. E., Yaffe, M. P., Guiard, B., Wiedemann, N. & Pfanner, N. (2004). The mitochondrial morphology protein Mdm10 functions in assembly of the preprotein translocase of the outer membrane. *Dev Cell*, *7*, pp. 61-71.

Meisinger, C., Wiedemann, N., Rissler, M., Strub, A., Milenkovic, D., Schonfisch, B., Muller, H., Kozjak, V. & Pfanner, N. (2006). Mitochondrial protein sorting: Differentiation of beta -barrel assembly by Tom7-mediated segregation of Mdm10. *J Biol Chem*, , .

Menzies, B. E. & Kourteva, I. (2000). Staphylococcus aureus alpha-toxin induces apoptosis in endothelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol*, *29*, pp. 39-45.

Mikhailov, V., Mikhailova, M., Degenhardt, K., Venkatachalam, M. A., White, E. & Saikumar, P. (2003). Association of Bax and Bak homo-oligomers in mitochondria. Bax requirement for Bak reorganization and cytochrome c release. *J Biol Chem*, *278*, pp. 5367-5376.

Milenkovic, D., Kozjak, V., Wiedemann, N., Lohaus, C., Meyer, H. E., Guiard, B., Pfanner, N. & Meisinger, C. (2004). Sam35 of the mitochondrial protein sorting and assembly machinery is a peripheral outer membrane protein essential for cell viability. *J Biol Chem*, *279*, pp. 22781-22785.

Minn, A. J., Velez, P., Schendel, S. L., Liang, H., Muchmore, S. W., Fesik, S. W., Fill, M. & Thompson, C.B. (1997). Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature*, *385*, pp. 353-357.

Model, K., Prinz, T., Ruiz, T., Radermacher, M., Krimmer, T., Kuhlbrandt, W., Pfanner, N. & Meisinger, C. (2002). Protein translocase of the outer mitochondrial membrane: role of import receptors in the structural organization of the TOM complex. *J Mol Biol*, *316*, pp. 657-666.

Mootha, V. K., Bunkenborg, J., Olsen, J. V., Hjerrild, M., Wisniewski, J. R., Stahl, E., Bolouri, M. S., Ray, H. N., Sihag, S., Kamal, M., Patterson, N., Lander, E. S. & Mann, M. (2003). Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria. *Cell*, *115*, pp. 629-640.

Moreau, C., Cartron, P., Hunt, A., Meflah, K., Green, D. R., Evan, G., Vallette, F. M. & Juin, P. (2003). Minimal BH3 peptides promote cell death by antagonizing anti-apoptotic proteins. *J Biol Chem*, *278*, pp. 19426-19435.

Motz, C., Martin, H., Krimmer, T. & Rassow, J. (2002). Bcl-2 and porin follow different pathways of TOM-dependent insertion into the mitochondrial outer membrane. *J Mol Biol*, *323*, pp. 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., Ng, S. L. & Fesik, S.W. (1996). X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature*, *381*, pp. 335-341.

Musse, A. A. & Merrill, A.R. (2003). The molecular basis for the pH-activation mechanism in the channel-forming bacterial colicin E1. *J Biol Chem*, *278*, pp. 24491-24499.

Nechushtan, A., Smith, C. L., Hsu, Y. T. & Youle, R.J. (1999). Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. *EMBO J*, *18*, pp. 2330-2341.

Nelson, K. L., Brodsky, R. A. & Buckley, J.T. (1999). Channels formed by subnanomolar concentrations of the toxin aerolysin trigger apoptosis of T lymphomas. *Cell Microbiol*, *1*, pp. 69-74.

Neupert, W. (1997). Protein import into mitochondria. *Annu Rev Biochem*, *66*, pp. 863-917.

Neuspiel, M., Zunino, R., Gangaraju, S., Rippstein, P. & McBride, H. (2005). Activated mitofusin 2 signals mitochondrial fusion, interferes with Bax activation, and reduces susceptibility to radical induced depolarization. *J Biol Chem*, *280*, pp. 25060-25070.

Newmeyer, D. D., Farschon, D. M. & Reed, J.C. (1994). Cell-free apoptosis in Xenopus egg extracts: inhibition by Bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria. *Cell*, 79, pp. 353-364.

Nguyen, M., Millar, D. G., Yong, V. W., Korsmeyer, S. J. & Shore, G.C. (1993). Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *J Biol Chem*, *268*, pp. 25265-25268.

Nicholson, D. W. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ*, *6*, pp. 1028-1042.

Oakes, S. A. & Korsmeyer, S.J. (2004). Untangling the web: mitochondrial fission and apoptosis. *Dev Cell*, *7*, pp. 460-462.

Olichon, A., Baricault, L., Gas, N., Guillou, E., Valette, A., Belenguer, P. & Lenaers, G. (2003). Loss of OPA1 perturbates the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem*, *278*, pp. 7743-7746.

Olichon, A., Emorine, L. J., Descoins, E., Pelloquin, L., Brichese, L., Gas, N., Guillou, E., Delettre, C., Valette, A., Hamel, C. P., Ducommun, B., Lenaers, G. & Belenguer, P. (2002). The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Lett*, *523*, pp. 171-176.

Oliver, L. & Vallette, F.M. (2005). The role of caspases in cell death and differentiation. *Drug Resist Updat*, *8*, pp. 163-170.

Oliver, L., Priault, M., Tremblais, K., LeCabellec, M., Meflah, K., Manon, S. & Vallette, F.M. (2000). The substitution of the C-terminus of bax by that of bcl-xL does not affect its subcellular localization but abrogates its pro-apoptotic properties. *FEBS Lett*, *487*, pp. 161-165.

Ott, M., Robertson, J. D., Gogvadze, V., Zhivotovsky, B. & Orrenius, S. (2002). Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*, pp. 1259-1263.

Parker, M. W. & Feil, S.C. (2005). Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Prog Biophys Mol Biol*, *88*, pp. 91-142.

Parrish, J., Li, L., Klotz, K., Ledwich, D., Wang, X. & Xue, D. (2001). Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in C. elegans. *Nature*, *412*, pp. 90-94.

Paschen, S. A., Waizenegger, T., Stan, T., Preuss, M., Cyrklaff, M., Hell, K., Rapaport, D. & Neupert, W. (2003). Evolutionary conservation of biogenesis of beta-barrel membrane proteins. *Nature*, *426*, pp. 862-866.

Patterson, S. D., Spahr, C. S., Daugas, E., Susin, S. A., Irinopoulou, T., Koehler, C. & Kroemer, G. (2000). Mass spectrometric identification of proteins released from mitochondria undergoing permeability transition. *Cell Death Differ*, *7*, pp. 137-144.

Pavlov, E. V., Priault, M., Pietkiewicz, D., Cheng, E. H., Antonsson, B., Manon, S., Korsmeyer, S. J., Mannella, C. A. & Kinnally, K.W. (2001). A novel, high conductance channel of mitochondria linked to apoptosis in mammalian cells and Bax expression in yeast. *J Cell Biol*, *155*, pp. 725-731.

Perfettini, J., Roumier, T. & Kroemer, G. (2005). Mitochondrial fusion and fission in the control of apoptosis. *Trends Cell Biol*, *15*, pp. 179-183.

Petros, A. M., Medek, A., Nettesheim, D. G., Kim, D. H., Yoon, H. S., Swift, K., Matayoshi, E. D., Oltersdorf, T. & Fesik, S.W. (2001). Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*, pp. 3012-3017.

Petros, A. M., Olejniczak, E. T. & Fesik, S.W. (2004). Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta*, *1644*, pp. 83-94.

Pfanner, N. (2000). Protein sorting: recognizing mitochondrial presequences. *Curr Biol*, *10*, p. R412-5.

Pfanner, N. & Wiedemann, N. (2002). Mitochondrial protein import: two membranes, three translocases. *Curr Opin Cell Biol*, *14*, pp. 400-411.

Pfanner, N., Craig, E. A. & Honlinger, A. (1997). Mitochondrial preprotein translocase. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *13*, pp. 25-51.

Pfanner, N., Wiedemann, N. & Meisinger, C. (2004). Cell biology. Double membrane fusion. *Science*, *305*, pp. 1723-1724.

Pouliquen, D., Bellot, G., Guihard, G., Fichet, P., Meflah, K. & Vallette, F.M. (2006). Mitochondrial membrane permeabilization produced by PTP, Bax and apoptosis: a 1H-NMR relaxation study. *Cell Death Differ*, *13*, pp. 301-310.

Praefcke, G. J. K. & McMahon, H.T. (2004). The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules?. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *5*, pp. 133-147.

Priault, M., Camougrand, N., Chaudhuri, B. & Manon, S. (1999). Role of the C-terminal domain of Bax and Bcl-XL in their localization and function in yeast cells. *FEBS Lett*, *443*, pp. 225-228.

Rapaport, D., Kunkele, K. P., Dembowski, M., Ahting, U., Nargang, F. E., Neupert, W. & Lill, R. (1998). Dynamics of the TOM complex of mitochondria during binding and translocation of preproteins. *Mol Cell Biol*, *18*, pp. 5256-5262.

Reed, J. C. & Green, D.R. (2002). Remodeling for demolition: changes in mitochondrial ultrastructure during apoptosis. *Mol Cell*, *9*, pp. 1-3.

Rehm, M., Dussmann, H. & Prehn, J.H.M. (2003). Real-time single cell analysis of Smac/DIABLO release during apoptosis. *J Cell Biol*, *162*, pp. 1031-1043.

Ricci, J., Munoz-Pinedo, C., Fitzgerald, P., Bailly-Maitre, B., Perkins, G. A., Yadava, N., Scheffler, I. E., Ellisman, M. H. & Green, D.R. (2004). Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain. *Cell*, *117*, pp. 773-786.

Roberts, D. L., Merrison, W., MacFarlane, M. & Cohen, G.M. (2001). The inhibitor of apoptosis protein-binding domain of Smac is not essential for its proapoptotic activity. *J Cell Biol*, *153*, pp. 221-228.

Roesch, K., Curran, S. P., Tranebjaerg, L. & Koehler, C.M. (2002). Human deafness dystonia syndrome is caused by a defect in assembly of the DDP1/TIMM8a-TIMM13 complex. *Hum Mol Genet*, *11*, pp. 477-486.

Ruffolo, S. C. & Shore, G.C. (2003). BCL-2 selectively interacts with the BID-induced open conformer of BAK, inhibiting BAK auto-oligomerization. *J Biol Chem*, *278*, pp. 25039-25045.

Ryan, M. T., Muller, H. & Pfanner, N. (1999). Functional staging of ADP/ATP carrier translocation across the outer mitochondrial membrane. *J Biol Chem*, *274*, pp. 20619-20627.

Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., van Gurp, M., van Loo, G. & Vandenabeele, P. (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*, *23*, pp. 2861-2874.

Saito, M., Korsmeyer, S. J. & Schlesinger, P.H. (2000). BAX-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. *Nat Cell Biol*, *2*, pp. 553-555.

Salvesen, G. S. & Abrams, J.M. (2004). Caspase activation - stepping on the gas or releasing the brakes? Lessons from humans and flies. *Oncogene*, *23*, pp. 2774-2784.

Salvesen, G. S. & Duckett, C.S. (2002). IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *3*, pp. 401-410.

Santel, A. (2006). Get the balance right: Mitofusins roles in health and disease. *Biochim Biophys Acta*, *1763*, pp. 490-499.

Sattler, M., Liang, H., Nettesheim, D., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Eberstadt, M., Yoon, H. S., Shuker, S. B., Chang, B. S., Minn, A. J., Thompson, C. B. & Fesik, S.W. (1997). Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science*, *275*, pp. 983-986.

Schagger, H. (2001). Blue-native gels to isolate protein complexes from mitochondria. *Methods Cell Biol*, *65*, pp. 231-244.

Schendel, S. L., Xie, Z., Montal, M. O., Matsuyama, S., Montal, M. & Reed, J.C. (1997). Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *94*, pp. 5113-5118.

Schlesinger, P. H., Gross, A., Yin, X. M., Yamamoto, K., Saito, M., Waksman, G. & Korsmeyer, S.J. (1997). Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *94*, pp. 11357-11362.

Schmidt, A., Wolde, M., Thiele, C., Fest, W., Kratzin, H., Podtelejnikov, A. V., Witke, W., Huttner, W. B. & Soling, H.D. (1999). Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid. *Nature*, *401*, pp. 133-141.

Scorrano, L. (2003). Divide et impera: Ca2+ signals, mitochondrial fission and sensitization to apoptosis. *Cell Death Differ*, *10*, pp. 1287-1289.

Scorrano, L. (2005). Proteins that fuse and fragment mitochondria in apoptosis: con-fissing a deadly con-fusion?. *J Bioenerg Biomembr*, *37*, pp. 165-170.

Scorrano, L., Ashiya, M., Buttle, K., Weiler, S., Oakes, S. A., Mannella, C. A. & Korsmeyer, S.J. (2002). A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev Cell*, *2*, pp. 55-67.

Scorrano, L., Oakes, S. A., Opferman, J. T., Cheng, E. H., Sorcinelli, M. D., Pozzan, T. & Korsmeyer, S.J. (2003). BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca2+: a control point for apoptosis. *Science*, *300*, pp. 135-139.

Scott, S. V., Cassidy-Stone, A., Meeusen, S. L. & Nunnari, J. (2003). Staying in aerobic shape: how the structural integrity of mitochondria and mitochondrial DNA is maintained. *Curr Opin Cell Biol*, *15*, pp. 482-488.

Sesaki, H., Southard, S. M., Hobbs, A. E. A. & Jensen, R.E. (2003). Cells lacking Pcp1p/Ugo2p, a rhomboid-like protease required for Mgm1p processing, lose mtDNA and mitochondrial structure in a Dnm1p-dependent manner, but remain competent for mitochondrial fusion. *Biochem Biophys Res Commun*, *308*, pp. 276-283.

Sever, S., Damke, H. & Schmid, S.L. (2000). Dynamin:GTP controls the formation of constricted coated pits, the rate limiting step in clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol*, *150*, pp. 1137-1148.

Shaw, J. M. & Nunnari, J. (2002). Mitochondrial dynamics and division in budding yeast. *Trends Cell Biol*, *12*, pp. 178-184.

Shi, Y. (2002). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell*, *9*, pp. 459-470.

Shimizu, S., Ide, T., Yanagida, T. & Tsujimoto, Y. (2000). Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c. *J Biol Chem*, *275*, pp. 12321-12325.

Shimizu, S., Narita, M. & Tsujimoto, Y. (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*, *399*, pp. 483-487.

Shiozaki, E. N., Chai, J., Rigotti, D. J., Riedl, S. J., Li, P., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Fairman, R. & Shi, Y. (2003). Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol Cell*, *11*, pp. 519-527.

Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H. E., Schonfisch, B., Perschil, I., Chacinska, A., Guiard, B., Rehling, P., Pfanner, N. & Meisinger, C. (2003). The proteome of Saccharomyces cerevisiae mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*, pp. 13207-13212.

Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D. L. & van der Bliek, A.M. (2001). Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell*, *12*, pp. 2245-2256.

Smirnova, E., Shurland, D. L., Ryazantsev, S. N. & van der Bliek, A.M. (1998). A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *J Cell Biol*, *143*, pp. 351-358.

Springs, S. L., Diavolitsis, V. M., Goodhouse, J. & McLendon, G.L. (2002). The kinetics of translocation of Smac/DIABLO from the mitochondria to the cytosol in HeLa cells. *J Biol Chem*, *277*, pp. 45715-45718.

Stojanovski, D., Koutsopoulos, O. S., Okamoto, K. & Ryan, M.T. (2004). Levels of human Fis1 at the mitochondrial outer membrane regulate mitochondrial morphology. *J Cell Sci*, *117*, pp. 1201-1210.

Strasser, A., O'Connor, L. & Dixit, V.M. (2000). Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem*, *69*, pp. 217-245.

Sugioka, R., Shimizu, S. & Tsujimoto, Y. (2004). Fzo1, a protein involved in mitochondrial fusion, inhibits apoptosis. *J Biol Chem*, *279*, pp. 52726-52734.

Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D. R., Aebersold, R., Siderovski, D. P., Penninger, J. M. & Kroemer, G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, *397*, pp. 441-446.

Suzuki, M., Youle, R. J. & Tjandra, N. (2000). Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell*, *103*, pp. 645-654.

Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K. & Takahashi, R. (2001). A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell*, *8*, pp. 613-621.

Takahashi, Y., Karbowski, M., Yamaguchi, H., Kazi, A., Wu, J., Sebti, S. M., Youle, R. J. & Wang, H. (2005). Loss of Bif-1 suppresses Bax/Bak conformational change and mitochondrial apoptosis. *Mol Cell Biol*, *25*, pp. 9369-9382.

Tan, C., Dlugosz, P. J., Peng, J., Zhang, Z., Lapolla, S. M., Plafker, S. M., Andrews, D. W. & Lin, J. (2006). Auto-activation of the apoptosis protein Bax increases mitochondrial membrane permeability and is inhibited by Bcl-2. *J Biol Chem*, *281*, pp. 14764-14775.

Tan, K. O., Fu, N. Y., Sukumaran, S. K., Chan, S., Kang, J. H., Poon, K. L., Chen, B. S. & Yu, V.C. (2005). MAP-1 is a mitochondrial effector of Bax. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*, pp. 14623-14628.

Tayebi, N., Callahan, M., Madike, V., Stubblefield, B. K., Orvisky, E., Krasnewich, D., Fillano, J. J. & Sidransky, E. (2001). Gaucher disease and parkinsonism: a phenotypic and genotypic characterization. *Mol Genet Metab*, *73*, pp. 313-321.

Taylor, S. W., Fahy, E., Zhang, B., Glenn, G. M., Warnock, D. E., Wiley, S., Murphy, A. N., Gaucher, S. P., Capaldi, R. A., Gibson, B. W. & Ghosh, S.S. (2003). Characterization of the human heart mitochondrial proteome. *Nat Biotechnol*, *21*, pp. 281-286.

Terrones, O., Antonsson, B., Yamaguchi, H., Wang, H., Liu, J., Lee, R. M., Herrmann, A. & Basanez, G. (2004). Lipidic pore formation by the concerted action of proapoptotic BAX and tBID. *J Biol Chem*, *279*, pp. 30081-30091.

Thuduppathy, G. R., Craig, J. W., Kholodenko, V., Schon, A. & Hill, R.B. (2006). Evidence that Membrane Insertion of the Cytosolic Domain of Bcl-x(L) is Governed by an Electrostatic Mechanism. *J Mol Biol*, *359*, pp. 1045-1058.

Tilley, S. J. & Saibil, H.R. (2006). The mechanism of pore formation by bacterial toxins. *Curr Opin Struct Biol*, *16*, pp. 230-236.

Tremblais, K., Oliver, L., Juin, P., Le Cabellec, T. M., Meflah, K. & Vallette, F.M. (1999). The C-terminus of bax is not a membrane addressing/anchoring signal. *Biochem Biophys Res Commun*, *260*, pp. 582-591.

van Loo, G., Demol, H., van Gurp, M., Hoorelbeke, B., Schotte, P., Beyaert, R., Zhivotovsky, B., Gevaert, K., Declercq, W., Vandekerckhove, J. & Vandenabeele, P. (2002b). A matrix-assisted laser desorption ionization post-source decay (MALDI-PSD) analysis of proteins released from isolated liver mitochondria treated with recombinant truncated Bid. *Cell Death Differ*, *9*, pp. 301-308.

van Loo, G., Schotte, P., van Gurp, M., Demol, H., Hoorelbeke, B., Gevaert, K., Rodriguez, I., Ruiz-Carrillo, A., Vandekerckhove, J., Declercq, W., Beyaert, R. & Vandenabeele, P. (2001). Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Differ*, *8*, pp. 1136-1142.

van Loo, G., van Gurp, M., Depuydt, B., Srinivasula, S. M., Rodriguez, I., Alnemri, E. S., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Declercq, W. & Vandenabeele, P. (2002a). The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ*, *9*, pp. 20-26.

van Wilpe, S., Ryan, M. T., Hill, K., Maarse, A. C., Meisinger, C., Brix, J., Dekker, P. J., Moczko, M., Wagner, R., Meijer, M., Guiard, B., Honlinger, A. & Pfanner, N. (1999). Tom22 is a multifunctional organizer of the mitochondrial preprotein translocase. *Nature*, *401*, pp. 485-489.

Vaux, D. L. & Korsmeyer, S.J. (1999). Cell death in development. *Cell*, *96*, pp. 245-254.

Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J. & Vaux, D.L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, *102*, pp. 43-53.

Waizenegger, T., Schmitt, S., Zivkovic, J., Neupert, W. & Rapaport, D. (2005). Mim1, a protein required for the assembly of the TOM complex of mitochondria. *EMBO Rep*, *6*, pp. 57-62.

Waizenegger, T., Stan, T., Neupert, W. & Rapaport, D. (2003). Signal-anchor domains of proteins of the outer membrane of mitochondria: structural and functional characteristics. *J Biol Chem*, *278*, pp. 42064-42071.

Wang, X., Ono, K., Kim, S. O., Kravchenko, V., Lin, S. C. & Han, J. (2001). Metaxin is required for tumor necrosis factor-induced cell death. *EMBO Rep*, *2*, pp. 628-633.

Waterhouse, N. J., Sedelies, K. A., Sutton, V. R., Pinkoski, M. J., Thia, K. Y., Johnstone, R., Bird, P. I., Green, D. R. & Trapani, J.A. (2006). Functional dissociation of DeltaPsim and cytochrome c release defines the contribution of mitochondria upstream of caspase activation during granzyme B-induced apoptosis. *Cell Death Differ*, *13*, pp. 607-618.

Wattenberg, B. & Lithgow, T. (2001). Targeting of C-terminal (tail)-anchored proteins: understanding how cytoplasmic activities are anchored to intracellular membranes. *Traffic*, *2*, pp. 66-71.

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

Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., Roth, K. A., MacGregor, G. R., Thompson, C. B. & Korsmeyer, S.J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*, *292*, pp. 727-730.

Westermann, B. (2003). Mitochondrial membrane fusion. *Biochim Biophys Acta*, *1641*, pp. 195-202.

Widlak, P., Li, L. Y., Wang, X. & Garrard, W.T. (2001). Action of recombinant human apoptotic endonuclease G on naked DNA and chromatin substrates: cooperation with exonuclease and DNase I. *J Biol Chem*, *276*, pp. 48404-48409.

Wiedemann, N., Frazier, A. E. & Pfanner, N. (2004). The protein import machinery of mitochondria. *J Biol Chem*, *279*, pp. 14473-14476.

Wiedemann, N., Kozjak, V., Chacinska, A., Schonfisch, B., Rospert, S., Ryan, M. T., Pfanner, N. & Meisinger, C. (2003). Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane. *Nature*, *424*, pp. 565-571.

Wiener, M., Freymann, D., Ghosh, P. & Stroud, R.M. (1997). Crystal structure of colicin Ia. *Nature*, *385*, pp. 461-464.

Willis, S. N., Chen, L., Dewson, G., Wei, A., Naik, E., Fletcher, J. I., Adams, J. M. & Huang, D.C.S. (2005). Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev*, *19*, pp. 1294-1305.

Yano, M., Terada, K. & Mori, M. (2004). Mitochondrial import receptors Tom20 and Tom22 have chaperone-like activity. *J Biol Chem*, *279*, pp. 10808-10813.

Ye, H., Cande, C., Stephanou, N. C., Jiang, S., Gurbuxani, S., Larochette, N., Daugas, E., Garrido, C., Kroemer, G. & Wu, H. (2002). DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat Struct Biol*, *9*, pp. 680-684.

Yoon, Y., Krueger, E. W., Oswald, B. J. & McNiven, M.A. (2003). The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Mol Cell Biol*, *23*, pp. 5409-5420.

Yoon, Y., Pitts, K. R. & McNiven, M.A. (2001). Mammalian dynamin-like protein DLP1 tubulates membranes. *Mol Biol Cell*, *12*, pp. 2894-2905.

Young, J. C., Hoogenraad, N. J. & Hartl, F.U. (2003). Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell*, *112*, pp. 41-50.

Zakharov, S. D. & Cramer, W.A. (2002a). Colicin crystal structures: pathways and mechanisms for colicin insertion into membranes. *Biochim Biophys Acta*, *1565*, pp. 333-346.

Zakharov, S. D. & Cramer, W.A. (2002b). Insertion intermediates of pore-forming colicins in membrane two-dimensional space. *Biochimie*, *84*, pp. 465-475.

Zamzami, N., Susin, S. A., Marchetti, P., Hirsch, T., Gomez-Monterrey, I., Castedo, M. & Kroemer, G. (1996). Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med*, *183*, pp. 1533-1544.

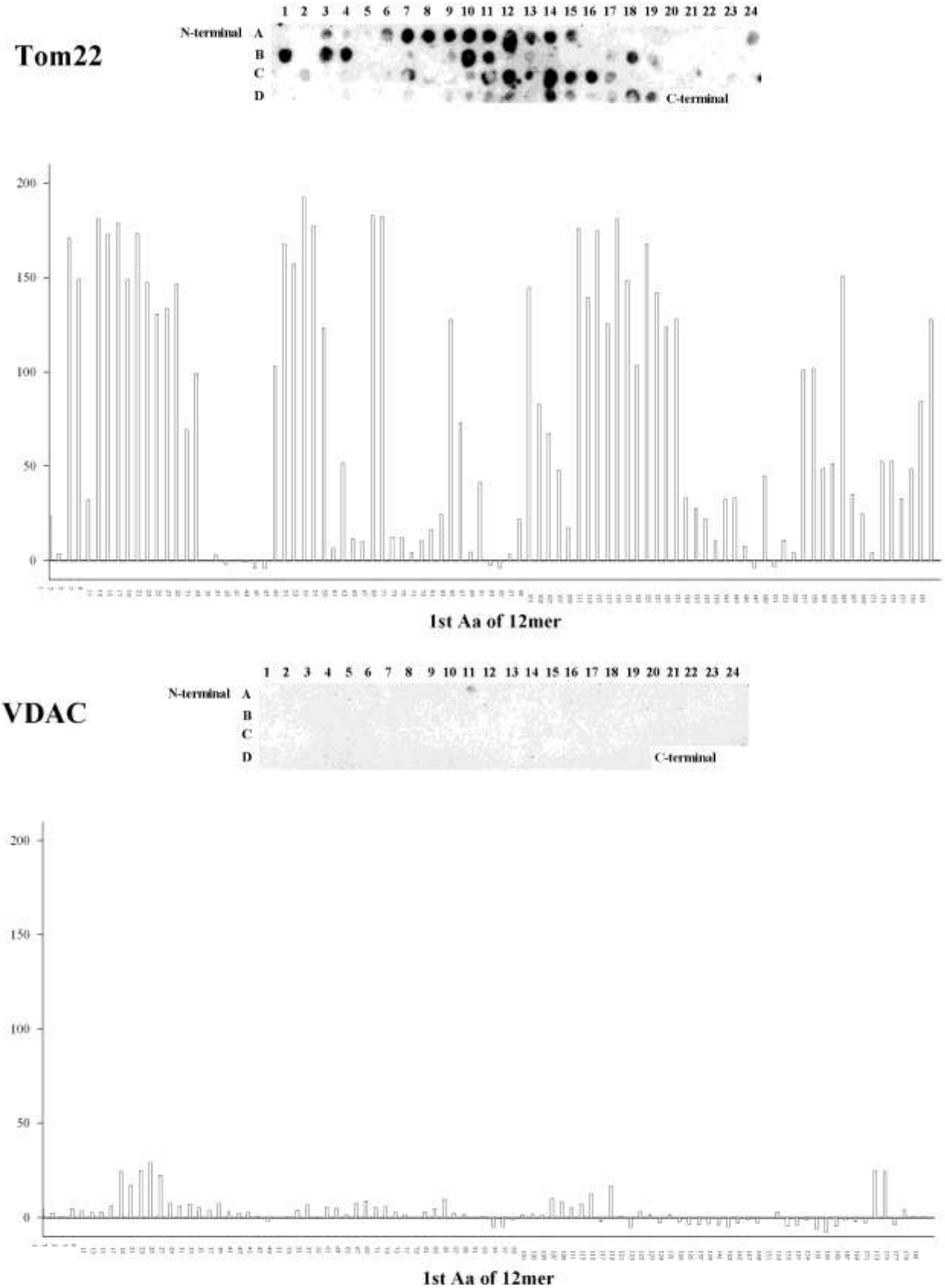
Zhang, P. & Hinshaw, J.E. (2001). Three-dimensional reconstruction of dynamin in the constricted state. *Nat Cell Biol*, *3*, pp. 922-926.

Zhu, P., Patterson, A., Stadler, J., Seeburg, D. P., Sheng, M. & Blackstone, C. (2004). Intra- and intermolecular domain interactions of the C-terminal GTPase effector domain of the multimeric dynamin-like GTPase Drp1. *J Biol Chem*, *279*, pp. 35967-35974.

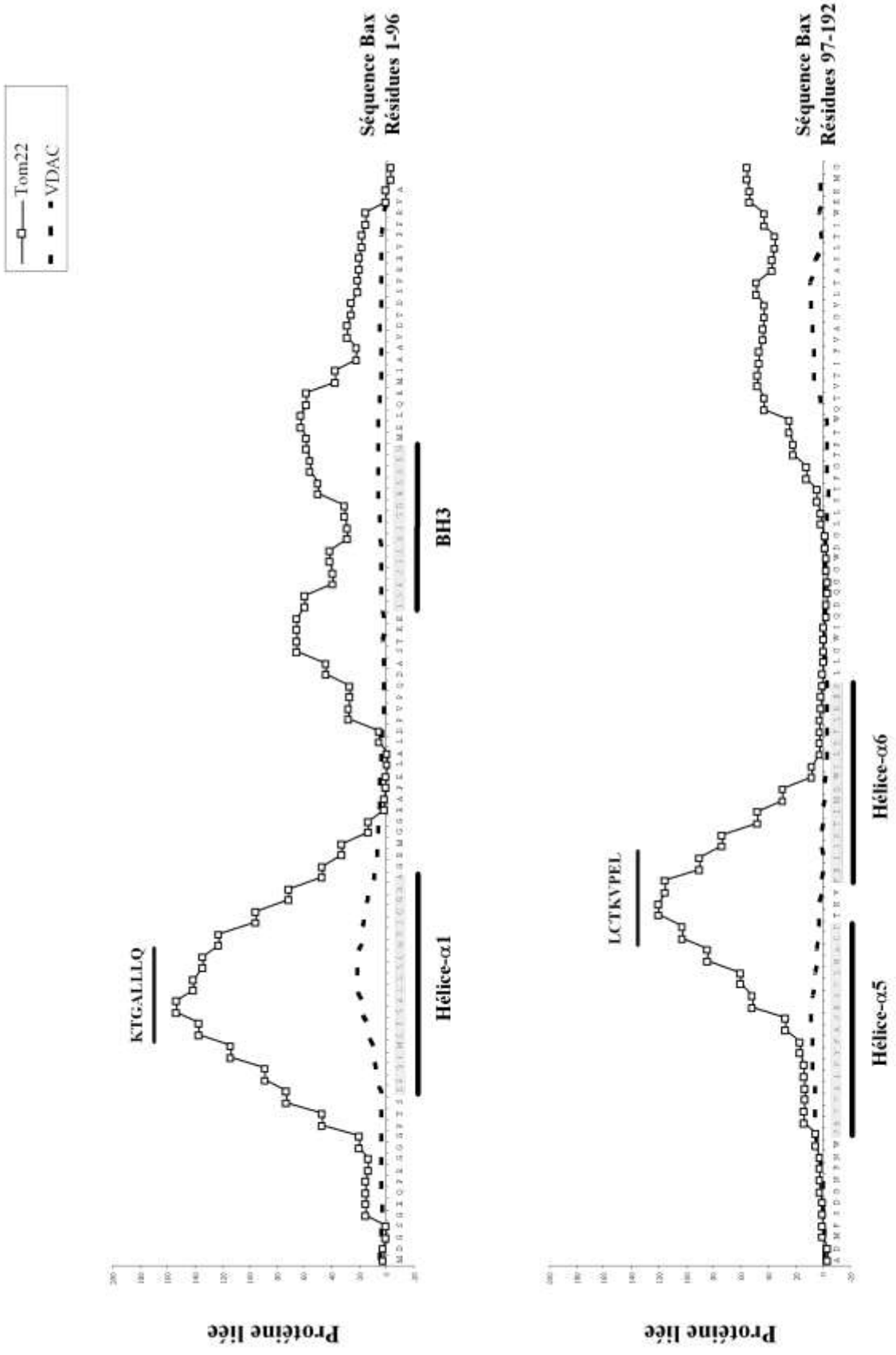
ANNEXE

Cette annexe reprend les résultats du peptide scan, technique utilisée dans le chapitre I pour déterminer les domaines de Bax interagissant avec la protéine Tom22. Cette annexe offre une résolution meilleure que celle de l'article ou des résultats complémentaires. La partie A montre à nouveau l'ensemble des résultats bruts obtenus pour l'analyse de l'interaction Bax/Tom22 avec le contrôle négatif réalisé avec le VDAC: révélation des membranes et histogrammes représentants l'intensité brut de liaison de Tom22 ou VDAC2 avec chaque peptide dérivé de la séquence de Bax. La partie B, l'analyse faite à partir des résultats bruts, représente l'intensité moyenne de liaison de chaque acide aminé de Bax avec Tom22 ou VDAC2.

A)


Tom22
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24
N-terminal
A
B
C
D
C-terminal
200
150
100
50
0
1st Aa of 12mer
VDAC
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24
N-terminal
A
B
C
D
C-terminal
200
150
100
50
0
1st Aa of 12mer

B)


Tom22
VDAC
Séquence Bax
Résidues 1-96
KTGALLLQ
BH3
Hélice-α1
Protéine liée
Séquence Bax
Résidues 97-192
LCTKVPEL
Hélice-α5
Hélice-α6
Protéine liée

Identification de nouveaux récepteurs mitochondriaux impliqués dans l'association des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak avec la membrane externe au cours de l'apoptose ; mise en évidence d'un nouveau système de régulation

La voie mitochondriale de l'apoptose est régulée par les protéines de la famille de Bcl-2. Bax et Bak induisent la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale et la libération de facteurs apoptogéniques comme le cytochrome c. Cependant les mécanismes moléculaires impliqués dans les étapes précoces du mécanisme d'action de Bax et de Bak restent mal connus. Les travaux présentés ici montrent l'existence de récepteurs mitochondriaux directement impliqués dans les fonctions de Bax et de Bak. Tom22 est le récepteur de Bax impliqué dans l'association de celui-ci à la mitochondrie lors de l'apoptose. La metaxine 2 puis la metaxine 1 interagissent avec Bak respectivement en conditions normales et apoptotiques. L'identification de ces partenaires mitochondriaux des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak permet de relier la machinerie d'importation des protéines de la membrane externe à la régulation des fonctions de ces protéines.

Mots clés: Apoptose, mitochondrie, Bax/Bak, complexes protéiques, importation de protéines, perméabilisation

Identification of new mitochondrial receptors involved in the association of the pro-apoptotic proteins Bax and Bak with the outer membrane during apoptosis; identification of a new regulation system

The Bcl-2 family of proteins regulates the mitochondrial pathway of apoptosis. Bax and Bak induce the permeabilization of the outer membrane and release of apoptogenic factors such as cytochrome c. However the early molecular events involved in Bax/Bak-induced permeabilization remain poorly understood. Here we have identified the mitochondrial receptors directly implicated in Bax/Bak functions. Tom22 is the receptor of Bax and is involved in Bax association with mitochondria during apoptosis. Metaxin 2 and metaxin 1 interact with Bak respectively in healthy condition and in apoptotic condition. The identification of these new mitochondrial partners of Bax and Bak represents a link between the import machinery of the mitochondrial outer membrane and the regulation of Bax/Bak functions.

Key words: Apoptosis, mitochondria, Bax/Bak, complex, protein import, permeabilization

1 Rue Basile Valentin, appartement 931

44100 Nantes