UNIVERSITE DE NANTES

U.F.R. MEDECINE ET TECHNIQUES MEDICALES

Implication de l'extrémité C-terminale de Bax dans son homo-oligomérisation au cours de l'apoptose.

THÈSE DE DOCTORAT

Ecole doctorale : Chimie-Biologie

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Biologie Cellulaire et Moléculaire

Présentée et soutenue publiquement par

ER Emine

le 14 Décembre 2006, devant le jury ci-dessous :

Présidente	Mme Martine Amiot, Directeur de Recherche INSERM, Nantes
Rapporteurs	M. Stéphen Manon, Chargé de Recherche CNRS, Bordeaux
	M. Burkhard Bechinger, Professeur d'Université, Strasbourg
Examinateur	M. Jean-Luc Vayssière, Professeur EPHE, Versailles SQY
Co-directeurs de thèse	Mme Lisa Oliver, Ingénieur de Recherche CHU, Nantes
	M. François M. Vallette, Directeur de Recherche INSERM, Nantes

SOMMAIRE

Abréviations ***6***

Les acides aminés et leurs symboles ***9***

Le code génétique au niveau de l'ARNm. ***10***

INTRODUCTION ***11***

I. Les mécanismes moléculaires de l'apoptose. **11**

1. Définition et historique de l'apoptose. 11
2. Du nématode *C. elegans* aux mammifères : conservation au cours de l'évolution. 14
3. Aspects cellulaires de l'apoptose : apoptose versus nécrose. 18
4. Physiologie de la mort cellulaire. 21
5. Les principales voies de l'apoptose. 22
   - 5. 1. Modèle triphasique. 24
     - 5. 1. 1. La phase d'initiation. 25
     - 5. 1. 2. La phase de décision. 25
     - 5. 1. 3. La phase d'exécution. 26
   - 5. 2. La voie extrinsèque. 26
     - 5. 2. 1. La voie de signalisation activée par Fas/FasL. 28
     - 5. 2. 2. La voie de signalisation activée par TNF/TNFR. 32
     - 5. 2. 3. Les autres récepteurs impliqués dans la voie extrinsèque. 34
   - 5. 3. La voie intrinsèque ou voie mitochondriale. 35
     - 5. 3. 1. Libération de cytochrome c et formation de l'apoptosome. 36
     - 5. 3. 2. Rôle des protéines Smac/Diablo et HtrA2/Omi. 38
     - 5. 3. 3. Rôle des protéines AIF et EndoG. 40
     - 5. 3. 4. Régulation de la voie mitochondriale. 42
   - 5. 4. Libération de cytochrome c : point de non-retour de l'apoptose ? 42
6. Les principaux acteurs moléculaires de l'apoptose. 44
   - 6. 1. Les caspases. 44
     - 6. 1. 1. Nomenclature. 44
     - 6. 1. 2. Structure des caspases. 46
     - 6. 1. 3. Activation des caspases. 47
     - 6. 1. 4. Les substrats des caspases. 52
     - 6. 1. 5. Régulation des caspases. 55
       - a. Régulation transcriptionnelle. 55
       - b. Régulation post-transcriptionnelle. 56
       - c. Régulation par des protéines naturelles. 57
       - d. Régulation post-traductionnelle. 65
     - 6. 1. 6. Invalidation génique. 65
     - 6. 1. 7. « Apoptose » caspase indépendante. 67
     - 6. 1. 8. Quelques autres fonctions des caspases. 69
7. Apaf-1 et l'Apoptosome. 71
8. Les protéines de la famille Bcl-2. 74
   - 8. 1. Présentation des membres de la famille Bcl-2. 74
   - 8. 2. Structure primaire des membres de la famille Bcl-2. 75
     - 8. 2. 1. Les domaines BH1 et BH2. 76
     - 8. 2. 2. Le domaine BH3. 77
     - 8. 2. 3. Le domaine BH4. 78
     - 8. 2. 4. Le domaine C-terminal. 78
   - 8. 3. Structure tridimensionnelle des membres de la famille Bcl-2. 79
   - 8. 4. Localisation subcellulaire des membres de la famille Bcl-2. 83
   - 8. 5. Interaction fonctionnelle des protéines de la famille Bcl-2. 85
   - 8. 6. Régulation de l'activité des membres de la famille Bcl-2. 87
     - 8. 6. 1. Par dimérisation. 87
     - 8. 6. 2. Par phosphorylation. 88

8. 6. 3. Par clivage. 89
8. 6. 4. Par la localisation sub-cellulaire. 90
8. 6. 5. Par régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle. 92
8. 7. Invalidation génique. 95
8. 8. Régulation de la voie intrinsèque de l'apoptose par les membres de la famille Bcl-2. 95
8. 8. 1. Propriété de formation de canaux. 95
8. 8. 2. Modèles de perméabilisation de la mitochondrie. 96

II. La protéine pro-apoptotique Bax au sein de la voie mitochondriale. 98
1. Généralités et structure. 98
2. Isoformes de Bax. 100
3. Mécanismes de régulation de Bax, d'adressage à la mitochondrie et perméabilisation de la MME. 102
Revue 1 103
MITOCHONDRIA AS THE TARGET OF THE PRO-APOPTOTIC PROTEIN BAX 103

III. Physiopathologie. 133
1. Les maladies comme conséquence de dérégulations de l'apoptose. 133
2. Implication des membres de la famille Bcl-2 dans les cancers. 133
3. Implication des membres de la famille Bcl-2 dans la chimio- et la radiorésistance. 138
4. Implication des membres de la famille Bcl-2 dans les maladies autres que les cancers. 139
5. Stratégies thérapeutiques axées sur les membres de la famille Bcl-2. 140
5. 1. Diminution de l'expression des protéines anti-apoptotiques. 141
5. 1. 1. Approche anti-sens. 141
5. 1. 2. Approche ARN interférence. 142
5. 1. 3. Approche ribozyme. 143
5. 2. Inhibition fonctionnelle des protéines anti-apoptotiques. 143
5. 2. 1. Les BH3 mimétiques. 143
5. 2. 2. Les peptides BH3. 144
5. 2. 3. Les composés naturels. 145
5. 3. Augmentation de l'expression ou activation de protéines pro-apoptotiques : le cas de Bax. 145
5. 3. 1. Augmentation de l'expression de Bax. 145
5. 3. 2. Activation de l'expression de Bax. 146

MATERIELS ET METHODES 150

I. MATERIELS BIOLOGIQUES 150
1. Souches bactériennes. 150
2. Plasmides. 150
2. 1. Vecteurs de clonage. 151
2. 1. 1. pCR II-TOPO (Invitrogen). 151
2. 1. 2. pGEM-T Easy (Promega) 151
2. 1. 3. pDONR 201 (Invitrogen) 152
2. 2. Vecteurs d'expression dans les cellules de mammifères. 154
2. 2. 1. pDEST 12.2 (Invitrogen) 154
2. 2. 2. pRc/CMV (Invitrogen) 154
2. 2. 3. pDsRed2-C1 (Clontech). 154
2. 3. Vecteur d'expression dans les bactéries : pDEST 17 155
3. Oligonucléotides utilisés. 156
3. 1. Oligonucléotides utilisés pour le clonage et/ou le séquençage. 156
3. 2. Oligonucléotides utilisés pour le séquençage. 156
3. 3. Oligonucléotides utilisés pour la mutagenèse. 157
4. Anticorps utilisés. 157
4. 1. Anticorps primaires. 157
4. 2. Anticorps secondaires. 158

II. METHODES DE Biologie moléculaire. 158
1. Milieux et conditions de culture bactérienne. 158
2. Transformations de cellules bactériennes. 159
2. 1. Préparation de bactéries compétentes au TSS. 159
2. 2. Transformation des bactéries rendues compétentes au TSS. 159

3. Minipréparation rapide d'ADN plasmidique à partir des bactéries transformées. 160
4. Midipréparation. 160
5. Dosage de l'ADN ou de l'ARN. 161
6. Séquençage des constructions de biologie moléculaire. 161
7. Mutagenèse dirigée. 161
8. Extraction d'ADN à partir d'un gel d'agarose et purification. 164
9. Reverse transcription (RT) et amplification par PCR. 164
10. Electrophorèse en gel d'agarose. 166
11. Digestion de restriction. 166
12. Ligation 166
13. Clonage : la technologie Gateway. 167
13. 1. Première étape : réaction de PCR. 167
13. 2. Réaction BP. 167
13. 3. Réaction LR. 168

III. METHODES DE Biologie cellulaire. 169
1. Milieux et conditions de culture cellulaire. 169
2. Transfection stable. 170
2. 1. Electroporation. 170
2. 2. Lipofection. 171
3. Induction de l'apoptose de cellules *in vitro* par des agents physico-chimiques. 172
4. Dénombrement des cellules non viables au bleu de trypan. 172
5. Microinjection 172
6. Microscopie confocale. 173
7. Extraction des protéines cellulaires totales 173
8. Dosage des protéines. 174
9. Fractionnement cellulaire 174
9. 1. Fractionnement pour l'obtention des fractions mitochondriales et cytosoliques. 174
9. 2. Fractionnement pour l'obtention des protéines mitochondriales. 175
10. Purification de mitochondries à partir d'organes sains isolés. 176
11. Synthèse *in vitro* de protéines. 176
12. Association dans un système acellulaire des protéines de la famille Bcl-2. 176
13. Pontage moléculaire ou Crosslinking. 177
14. Immunoprécipitation. 178
15. Gels bidimensionnels (2D). 178
15. 1. Préparation des échantillons. 178
15. 2. BN-PAGE (1ère dimension). 178
15. 3. SDS-PAGE (2nde dimension). 179
16. Gel SDS-PAGE 180
16. 1. Préparation des échantillons. 180
16. 2. Electrophorèse. 180
17. Western-blot. 181
17. 1. Electrotransfert. 181
17. 1. 1. Transfert semi-sec. 181
17. 1. 2. Transfert liquide. 181
17. 2. Incubation avec les anticorps 182
17. 3. Réaction de chimioluminescence. 182
18. Dosage des activités caspases. 182

RÉSULTATS 184

I. IMPLICATION de l'EXTRÉMITÉ C-terminale de Bax dans son oligomÉrisation au cours de l'apoptose. 184
Article 1 191
CONTROL OF BAX HOMO-DIMERIZATION BY ITS CARBOXY-TERMINAL. 192

II. TOM22 EST UN RÉCEPTEUR MITOCHONDRIAL DE BAX. 216
Article 2 219
TOM22, a core component of the mitochondria outer membrane protein translocation pore, is a mitochondrial receptor of Bax. 219

Article 2 223
TOM 22, A CORE COMPONENT OF THE MITOCHONDRIA OUTER MEMBRANE PROTEIN TRANSLOCATION PORE, IS A MITOCHONDRIAL RECEPTOR FOR THE PRO-APOPTOTIC PROTEIN BAX 223

III. Purification de la PROTÉINE pro-apoptotique bax. 257

IV. AUTRES RESULTATS 277

Conclusion et DISCUSSION générale. 281

I. Activation et adressage de Bax à la mitochondrie. 281

II. Oligomérisation de Bax. 288

III. Association de Bax à la mitochondrie et perméabilisation mitochondriale. 301

Bibliographie 308

RESUME 357

ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ADP : adénosine diphosphate

Amp^R : gène de résistance à l'ampicilline

ARN : acide ribonucléique.

ARNm : acide ribonucléique messager

ARNr : acide ribonucléique ribosomique

ARNt : acide ribonucléique de transfert

ATP : adénosine triphosphate

BN-PAGE : électrophorèse sur gel polyacrylamide en condition native

Da : Dalton

dATP : désoxyadénosine triphosphate

DMSO : diméthyl sulfoxyde

DNase I : Désoxyribonucléase I

dNTP : désoxyribonucléoside triphosphate

DO : densité optique

$\Delta\Psi m$: potentiel électrique de la membrane mitochondriale interne

DTT : dithiotréitol

EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique

EGTA : acide éthylène glycol-bisβ-aminoéthyl ether – N, N, N', N' tetra acétique

Eto : Etopiside

g : vitesse en gravité

GTP : guanosine triphosphate

IPTG : isopropyl β-D thiogalactopyranoside

Kan^R : gène de résistance à la kanamycine

kDa : kilodalton

Mito : mitochondrie

MME : membrane mitochondriale externe

MMI : membrane mitochondriale interne

ORF : Open Reading Frame (cadre ouvert de lecture)

pb : paire de bases

PBS : phosphate buffer saline

PCR : réaction de polymérisation en chaîne (polymerase chain reaction)

pH : potential hydrogène

RE : réticulum endoplasmique

RIPA: Radio-Immunoprecipitation Assay

RMN : résonance magnétique nucléaire

ROS : espèces réactives de l'oxygène

rpm : tour par minute

RT : reverse transcription

SDS : sodium dodécyl sulphate

SDS-PAGE : électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante

STS : staurosporine

Tm : température de fusion

Ufc : unité formant colonie

UV : ultra-violet

LES ACIDES AMINES ET LEURS SYMBOLES

Acide aminé	Code à 3 lettres	Code à 1 lettre
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Aspartate	Asp	D
Cystéine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Glutamate	Glu	E
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Méthionine	Met	M
Phénylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Sélénocystéine	SeC	SeC
Sérine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

Tableau 1 : Symboles des acides aminés.

LE CODE GENETIQUE AU NIVEAU DE L'ARNm.

1ère position		2nde position U	2nde position C	2nde position A	2nde position G	3ème position	3ème position
		UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys	U	
		UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys	C	
	U	UUA Leu	UCA Ser	UAA Stop	UGA Stop	A	
		UUA Leu	UCG Ser	UAG Stop	UGG Trp	G	
		CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg	U	
		CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg	C	
	C	CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg	A	
		CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg	G	
		AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser	U	
		AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser	C	
	A	AUA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg	A	
		AUG Met	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg	G	
		GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly	U	
		GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly	C	
	G	GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly	A	
		GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly	G	

Tableau 2 : le code génétique.

INTRODUCTION

I. LES MECANISMES MOLECULAIRES DE L'APOPTOSE.

1. Définition et historique de l'apoptose.

Le terme apoptose, dérivé d'un mot grec décrivant la chute des feuilles mortes d'un arbre en automne (***apo*** pour éloignement et ***ptose*** pour chute), est utilisé pour désigner un type de mort cellulaire programmée, qui joue un rôle fondamental au cours du développent embryonnaire et dans le maintien de l'homéostasie tissulaire et cellulaire tout au long de la vie. Elle est la voie physiologique normale d'élimination des cellules superflues ou potentiellement dangereuses de l'organisme, qui survient en l'absence de toute maladie et qui fait partie intégrante du programme de développement d'une cellule. La notion d'apoptose a été introduite en 1972 par Kerr et coll. pour désigner une forme de mort cellulaire totalement différente de la nécrose, tant d'un point de vue morphologique que biochimique (Kerr *et al.,* 1972). La nécrose était en effet déjà connue comme une mort cellulaire accidentelle causée par des perturbations environnementales violentes et qui est morphologiquement caractérisée par un gonflement du cytoplasme, la destruction des organelles et la rupture de la membrane plasmique conduisant à une lyse cellulaire totale et propagée au sein du tissu, provoquant ainsi une réaction inflammatoire. Par opposition, l'apoptose semble n'affecter que des cellules isolées dans des tissus sains. Au cours de l'apoptose, les cellules mettent en place un « mécanisme de suicide » qui se traduit par de nombreux changements morphologiques: la membrane plasmique se désorganise, la cellule se détache des autres cellules dans les tissus, la chromatine se condense en périphérie du noyau avant d'être dégradée en un profil caractéristique dit en « barreaux d'échelle », la cellule se fragmente en corps apoptotiques qui sont ensuite rapidement éliminés par les cellules voisines par phagocytose. Cette élimination est primordiale car elle permet de ne laisser aucune trace dans le tissu où survient l'apoptose, en particulier, elle prévient toute nécrose secondaire qui aurait pour conséquence la libération aléatoire du contenu cellulaire et permettrait ainsi de limiter l'établissement d'une réaction inflammatoire (figure 1).

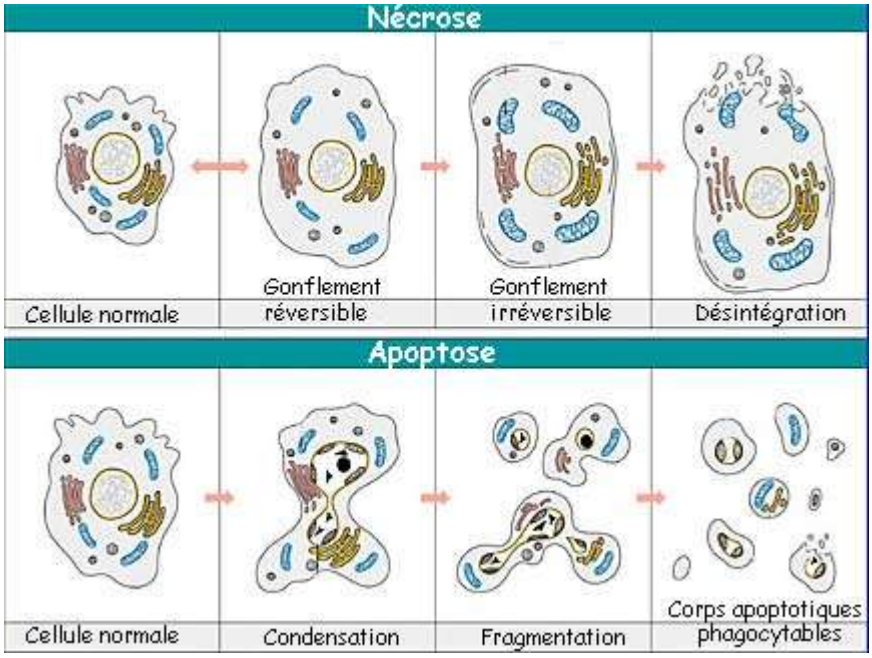


Figure 1 : Schéma Apoptose versus Nécrose.

Le concept que la mort de certains tissus puisse être normale remonte à la renaissance, avec l'observation de la métamorphose des insectes et des amphibiens. En 1842, Vogt décrit pour la première fois un phénomène de mort physiologique observée au cours de la métamorphose des amphibiens. Mais la reconnaissance que la mort est un phénomène biologique important n'est venue que beaucoup plus tard avec l'essor du microscope et de la théorie cellulaire. À la fin du XIX^{e} et au début du XX^{e} siècle, de nombreuses études de biologie du développement (pour revue, Zakeri et Lockshin, 2002) ont contribué à l'idée d'une mort cellulaire physiologique et active.

Dans les années 1960, il devient clair que la mort cellulaire est un processus essentiel à la vie. C'est en 1965 que Lockshin et Williams (1965a; 1965b; 1965c), en étudiant la métamorphose des papillons, ont introduit l'expression « mort cellulaire programmée » (MCP). En 1960, le pathologiste australien Keer a décrit une nécrose condensée. Par la suite, Kerr rejoint Wyllie et Curie et leurs travaux les mènent à proposer la classification de la mort cellulaire en deux catégories : apoptotique ou nécrotique (Kerr *et al.,* 1972). Ils définissent les bases morphologiques et biochimiques d'un type de mort cellulaire programmée qu'ils nomment

apoptose. En outre, ils stipulent que l'apoptose est liée à un programme de mort intracellulaire qui peut être inhibé ou activé par divers stimuli environnementaux, physiologiques ou pathologiques.

Peu après, les premiers marqueurs biochimiques de l'apoptose ont été reconnus, soit l'activation d'endonucléases (Williams *et al.,* 1974) et la digestion de l'ADN génomique en fragments de longueurs spécifiques formant des « échelles » (Wyllie, 1980). Mais l'acceptation générale de l'idée d'un programme de mort, essentiellement programmé dans les gènes, n'est vraiment venue que beaucoup plus tard.

C'est grâce aux découvertes des processus génétiques et biochimiques régulant la MCP que cette notion a progressé rapidement. Au début des années 1980, les travaux pionniers de Horvitz et collaborateurs (Hedgecock *et al.*, 1983) avec le nématode *Caenorhabditis elegans*, chez lequel exactement 131 des 1090 cellules somatiques meurent lors du développement normal, ont conduit à l'identification de toute une gamme de gènes spécifiques à la MCP. Parmi ceux-ci, notons *ced-3* et *ced-4* (*ced* pour *cell death*), dont les fonctions sont requises pour l'initiation de la MCP lors du développement du ver (Ellis et Horvitz, 1986); mais ce n'est que beaucoup plus tard que le premier gène *ced* a été cloné et séquencé (Yuan et Horvitz, 1992). Chez l'humain, le gène *bcl-2* (pour *b-cell lymphoma*), initialement identifié lors d'une translocation souvent associée à une des formes de cancer des cellules sanguines les plus courantes, a été le premier régulateur dont la fonction dans l'apoptose a été éclaircie(Tsujimoto *et al.,* 1984 ; Tsujimoto et Croce, 1986 ; Cleary *et al.,* 1986). La surexpression de *bcl-2*, contrairement à d'autres oncogènes connus à l'époque (*c-myc* par exemple), ne stimule pas la prolifération cellulaire, mais exerce plutôt son action en empêchant la MCP causée par le retrait du facteur de croissance (Vaux *et al.,* 1988). L'idée que des cancers pouvaient être causés par une absence d'apoptose a ouvert la voie à la frénésie actuelle de la recherche dans ce domaine. Dans les années qui ont suivi, l'apoptose s'est révélée être une composante importante dans des maladies auto-immunes et le développement général du système immunitaire (Strasser *et al.,* 1991), puis dans le SIDA et dans des maladies dégénératives du système nerveux, comme le Parkinson et l'Alzheimer (revue par Duke *et al.,* 1996). Ainsi, comprendre le déroulement de l'apoptose contribuerait à la mise au point de stratégies d'actions artificielles (activation ou répression du processus) à des fins thérapeutiques. Depuis, la croissance du domaine de recherche concernant la MCP ne cesse d'être exponentielle (Vaux, 2002).

2. Du nématode *C. elegans* aux mammifères : conservation au cours de l'évolution.

De par son importance dans de nombreux processus biologiques, la mort cellulaire programmée est un phénomène très répandu chez tous les métazoaires (Tittel et Steller, 2000) comme les mammifères, les insectes (Richardson et Kumar, 2002), les nématodes (Liu et Hengartner, 1999) et les cnidaires (Cikala *et al.,* 1999). En outre, la mort cellulaire programmée jouerait aussi un rôle dans la biologie des plantes (Solomon *et al.,* 1999), et des mécanismes semblables à l'apoptose ont été observés chez la levure qui a alors été utilisée comme modèle (Frohlich et Madeo, 2000 ; Skulachev, 2002). La mort cellulaire programmée fait aussi partie intégrante du cycle de vie d'autres organismes unicellulaires eucaryotes (comme le kinetoplastide parasite *Trypanosoma brucei brucei*, le cilié *Tetrahymena thermophila* et l'amibe *Dictyostelium discoideum*) et même certains procaryotes (comme *Bacillus subtilis*, *Streptomyces* et *Myxobacteria*) subissent une mort cellulaire régulée (Ameisen, 2002), donnant un fascinant aperçu de l'origine et de l'évolution de la mort cellulaire programmée.

La majeure partie de nos connaissances actuelles sur les mécanismes moléculaires de la régulation de l'apoptose provient de travaux menés sur le nématode *Cænorhabditis elegans* (Hengartner et Horvitz, 1994). Ainsi, la sélection par mutagenèse aléatoire de larves présentant des défauts d'élimination des cellules au cours du développement a permis l'identification de 11 gènes impliqués dans la régulation de la mort cellulaire programmée chez *C. elegans*.

Parmi cela, 3 furent identifiés comme des régulateurs clé de l'apoptose dans toutes les cellules somatiques, il s'agit de *ced-3*, *ced-4* et *ced-9* (ced pour *Cænorhabditis elegans death*). *ced-3* et *ced-4* sont tout deux requis pour la mort cellulaire. En effet, une mutation conduisant à une inactivation de l'un ou l'autre de ces gènes aboutit au blocage de l'apoptose dans chacune des 131 cellules somatiques du ver. *ced-9*, pour sa part, à une fonction antagoniste de *ced-3* et *ced-4* en ce sens qu'il est capable de promouvoir la survie. Ainsi une perte partielle de fonction de *ced-9* est létale, suite à une mort cellulaire exacerbée, alors qu'un gain de fonction de *ced-9* conduit à un excès cellulaire.

Le clonage de ces différents gènes a révélé que (figure 2) :

- *ced-3* code pour une protéase à cystéine homologue à l'enzyme de conversion de l'IL-1b (ICE, aussi désignée caspase 1) (Yuan *et al.,* 1993).
- *ced-4* code pour une protéine homologue à la protéine humaine Apaf-1 (Zou *et al.,* 1997).
- *ced-9* code pour une protéine homologue à la protéine anti-apoptotique Bcl-2 préalablement identifiée chez l'Homme (White, 1996).

Il a été démontré que CED-4 est capable d'interagir à la fois avec CED-3 et CED-9 (Chinnaiyan *et al.,* 1997). Ce résultat rend bien compte des différents niveaux de régulation entre ces protéines et leurs homologues chez les mammifères. Cependant, une étude récente montre que Bcl-2 ne peut pas s'associer directement avec la protéine activatrice des caspases CED-4, homologue d'Apaf-1, ni inhiber la mort cellulaire dépendante de CED-4 (Jabbour *et al.,* 2006). En revanche, Bcl-2 semble capable d'interagir avec EGL-1, homologue de protéine pro-apoptotique à BH3 seulement. Ces résultats suggèrent que Bcl-2 inhibe la mort cellulaire en empêchant EGL-1 d'antagoniser CED-9, plutôt que par inhibition de CED-4. Chaque famille de protéine sera analysée plus en détail dans la suite de ce manuscrit.

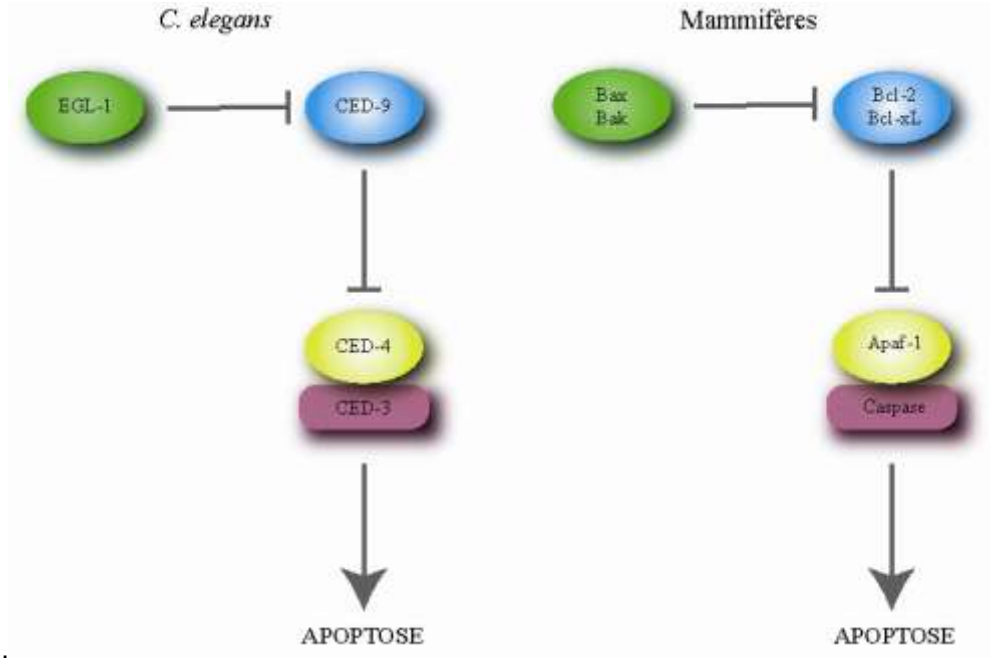


Figure 2 : Schéma simplifié représentant les protéines essentielles au programme de mort cellulaire chez *C.elegans* et chez les mammifères.

Les gènes impliqués dans l'exécution par apoptose de la mort cellulaire programmée ont été conservés au cours de l'évolution. Toutefois, le contrôle de l'engagement dans ce processus varie

selon les organismes. Chez *C. elegans*, l'approche génétique a permis de montrer que l'exécution de l'apoptose est essentiellement assurée par le gène *ced-3*, qui code pour une protéase à cystéine appartenant à la famille des caspases dont l'activité est contrôlée par les protéines CED-4 et CED-9. Ces gènes ont des homologues chez les mammifères, mais le contrôle de l'activation des caspases y est plus complexe. Un autre organisme, la drosophile, présente une complexité intermédiaire entre le nématode et les mammifères pour la régulation et l'exécution de l'apoptose (figure 3). La drosophile fournit ainsi un modèle de choix pour l'étude du contrôle de l'apoptose. En effet, cet organisme pourrait permettre d'identifier des voies de signalisation et de régulation conservées chez les mammifères.

Trois familles de protéines impliquées dans l'apoptose ont été trouvées chez *Drosophila melanogaster* (figure 3): (i) les homologues des caspases (Dronc, Dredd, Drice, Dcp1, Decay) ; (ii) des activateurs de caspases (équivalent d'Apaf-1 appelé DARK, HAC-1 ou Dapaf-1) ; (iii) et des protéines de la famille Bcl-2 (l'anti-apoptotique Buffy, le pro-apoptotique Debcl). Chez la drosophile, comme chez les mammifères, des inhibiteurs de caspase (mammifère : IAP, Inhibitor of Apoptosis Proteins ; drosophile : DIAP, Drosophila IAP) et des protéines capables de lever cette inhibition (mammifères : Smac/DIABLO ; drosophile : Reaper, HID, GRIM…) participent aussi au contrôle de l'activité des caspases (Mignotte *et al.,* 2005).

En conclusion, tout comme l'approche génétique chez le nématode, qui a permis de caractériser les gènes impliqués dans l'exécution du programme de mort cellulaire, l'identification des gènes de mammifères apparentés à *rpr* et aux *iap* permet d'espérer que l'étude génétique de l'apoptose chez la drosophile permettra d'identifier des voies de signalisation et de régulation conservées chez les mammifères.

Ainsi, l'apoptose est un phénomène hautement conservé des organismes unicellulaires jusqu'aux mammifères. A ce titre, les éléments comparatifs majeurs de la mort cellulaire programmée entre les vertébrés, le nématode *C. elegans* et la drosophile sont résumés dans le tableau ci-après (tableau 3).

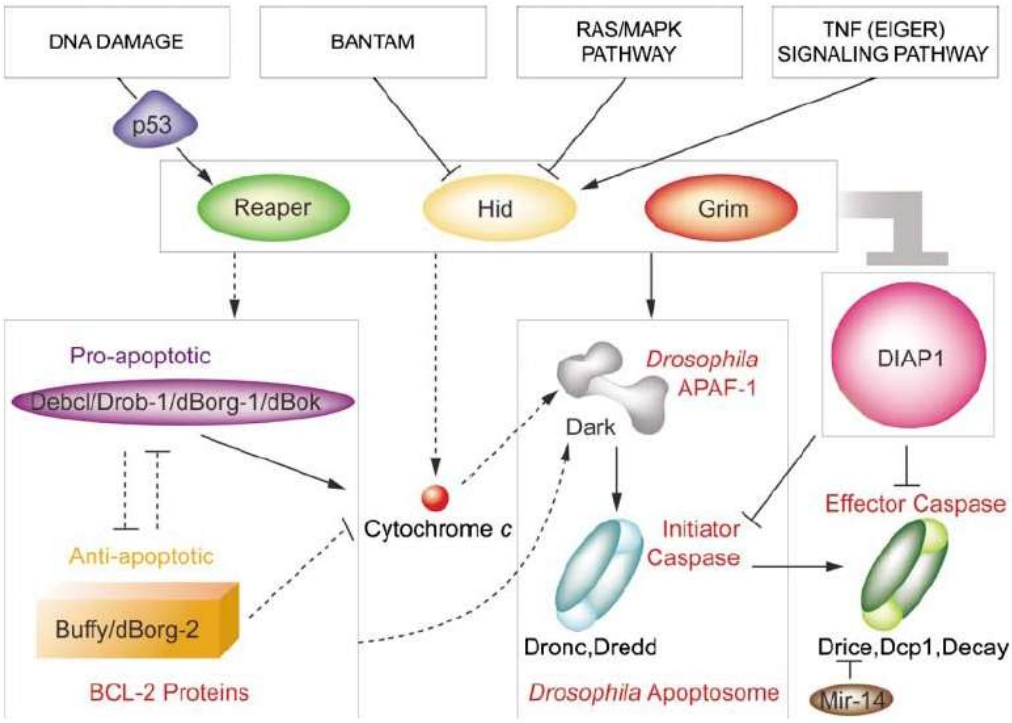


Figure 3 : L'apoptose chez la Drosophile (figure tirée de Danial et Korsmeyer, 2004). De multiples voies régulent et activent Reaper, Hid et Grim (RHG), les trois protéines proapoptotiques essentielles à la régulation de la mort cellulaire chez *Drosophila*. Les protéines RHG semblent contrôler l'activation des caspases (Dronc, Dredd, Drice, Dcp1, Decay) par de multiples mécanismes, notamment par la formation d'un complexe de type apoptosome contenant la protéine Dark (équivalent d'Apaf-1) et par l'activation Dark-indépendante de caspases en antagonisant les inhibiteurs de caspases comme DIAP1. Les protéines RHG seraient capables d'activer les caspases par changement conformationnel ou relargage de cytochrome c. Les homologues anti- et pro-apoptotiques des protéines de la famille Bcl-2 chez la drosophile agissent en aval ou en parallèle aux protéines RHG et influencent l'activation des caspases. Les microARN Bantam et Mir-14 inhibent l'apoptose chez la drosophile en supprimant Hid et Drice respectivement. Les voies possibles sont indiquées par des flèches discontinues.

Organisme	**Inducteurs**	**Inhibiteurs/ Activateurs**	**Adaptateurs**	**Protéases**		
Caenorhabditis elegans	EGL-1	CED-9	CED-4	CED-3		**APOPTOSE**
Vertébrés	Protéines à BH3 seulement : Bad, Bim, Bid…	Bcl-2/Bax	Apaf-1	Caspase initiatrice Caspase-9	Caspase effectrice Caspase-3	
Drosophila melanogaster	?	Buffy/Debcl	DARK	Dronc	drICE	

Tableau 3 : Conservation des différentes grandes familles de protéines impliquées dans l'apoptose, depuis le nématode jusqu'aux vertébrés.

3. Aspects cellulaires de l'apoptose : apoptose versus nécrose.

L'apoptose, processus actif génétiquement régulé, se distingue classiquement de la nécrose qui résulte d'une destruction pathologique passive des cellules. Il faut souligner cependant que ces deux formes de mort cellulaire ne sont pas exclusives. Le déroulement de l'apoptose en réponse à des conditions subléthales nécessitant un métabolisme énergétique préservé, l'épuisement des réserves en ATP en cas d'aggravation des lésions peut précipiter la mort nécrotique des cellules. C'est le cas des l'infarctus du myocarde ou des accidents vasculaires cérébraux: l'ischémie provoque une nécrose de la zone centrale des tissus atteints; cette zone est entourée d'une couronne de tissu dit « à risque» qui peut selon l'évolution des troubles vasculaires (et le traitement) évoluer vers la restauration, l'apoptose ou la nécrose.

La nécrose est considérée comme une mort cellulaire "désordonnée". La nécrose se caractérise essentiellement par la destruction massive et rapide des populations cellulaires par lyse osmotique: une entrée massive d'eau secondaire à l'arrêt de l'activité des pompes membranaires provoque un gonflement des cellules suivie d'une rupture des membranes, de la destruction des organites et de la libération du contenu cellulaire. Cette véritable explosion cellulaire conduit au relargage dans le milieu environnant du contenu cytoplasmique (en particulier des enzymes lytiques) dans l'espace extracellulaire. L'ADN nucléaire va être dégradé de manière aléatoire (Bicknell et Cohen, 1995; Dong *et al.,* 1997) par des endonucléases activées notamment par des sérines protéases (Dong *et al.,* 1997). *In vivo*, la dissémination du contenu cellulaire dans l'espace extracellulaire déclenche une réaction inflammatoire (Kerr *et al.,* 1972).

Par opposition à la nécrose, l'apoptose est considérée comme une mort cellulaire "ordonnée", procédant par différentes phases (Duvall et Wyllie, 1986; Kerr *et al.,* 1972) et ce quelle que soit la voie d'induction (radiation, présence de molécules chimiques ou hormonales, mitose incomplète,…). L'apoptose, contrairement à la nécrose, élimine sélectivement les cellules, provoque une condensation de la cellule et préserve l'intégrité des organites et des macromolécules jusqu'à un stade avancé (tableau 4). L'ensemble du processus apoptotique se déroule sur plusieurs heures et n'induit pas de réponse inflammatoire.

Tout d'abord les cellules en apoptose vont s'isoler des autres cellules (perte des contacts entre les cellules). L'un des points morphologiques caractéristiques de l'apoptose est l'importante

condensation à la fois du noyau et du cytoplasme ce qui induit une diminution significative du volume cellulaire. La mitochondrie de la cellule apoptotique va subir plusieurs modifications majeures : relargage du cytochrome c dans le cytoplasme (Kluck *et al.,* 1997; Yang *et al.,* 1997), diminution du potentiel membranaire ΔΨm et de la transition de la perméabilité mitochondriale (PT, permeability transition) qui permet l'ouverture de pores PT spécialisés (Marchetti *et al.,* 1996; Vander Heiden *et al.,* 1997; Zamzami *et al.,* 1996). Le noyau se condense, puis la chromatine est clivée en fragments réguliers d'environ 180 pb (Wyllie, 1980 ; Wyllie *et al.,* 1984). Plusieurs DNAses (DNases I et II) semblent être impliquées dans cette étape de fragmentation. Il a été montré que la protéine DFF45 (DNA fragmentation factor of 45 kDa molecular weight) (Liu *et al.,* 1998) serait clivée par la caspase 3 et activerait une désoxyribonucléase soit par interaction directe dans le noyau, soit par interaction avec une protéine de la surface externe de l'enveloppe nucléaire qui assurerait la transduction du signal vers une nucléase spécialisée dans la dégradation et la fragmentation de l'ADN. De plus, plusieurs protéines comme les laminines A, B, et C ont été décrites comme susceptibles de participer à la condensation de la chromatine (Rao *et al.,* 1996). La membrane plasmique va bourgeonner et conduire à la formation de corps apoptotiques renfermant une partie du cytoplasme de la cellule. Afin de faciliter la reconnaissance des corps apoptotiques par les phagocytes, la cellule va signaler son état apoptotique à son environnement notamment grâce au changement de localisation des molécules de phosphatidylsérines qui passent d'une orientation cytoplasmique vers une orientation extracellulaire (Fadok *et al.,* 1992 ; Savill *et al.,* 1993 ; Fadeel et al., 1999a). Cette élimination est primordiale car elle permet de ne laisser aucune trace dans les tissus où survient l'apoptose et limite ainsi l'établissement d'une réaction inflammatoire *in vivo* (Hoffman *et al.,* 2005). L'un des points majeurs de l'apoptose est que l'intégrité de la membrane plasmique n'est jamais altérée au cours du processus, ce qui permet d'éviter tout déversement du contenu cellulaire et ainsi prévenir tout dommage infligé aux tissus environnants. Toutefois, on peut noter que l'inflammation n'est pas nécessairement totalement absente durant l'apoptose (en raison du relarguage de l'IL-1 et IL-18 (IL, interleukine) dans l'environnement), mais il s'agit d'une inflammation régulée.

La mort cellulaire programmée est, malgré tous les événements mis en jeu, un processus rapide (quelques heures), mais cependant très lent comparativement à la nécrose. Plusieurs observations indiquent que l'apoptose est dépendante de la présence d'énergie. Leist et coll. ont raporté que des cellules soumises à un stimulus apoptotique et devant être soumise à

l'apoptose sont forcées de mourir par nécrose lorsque les niveaux d'ATP sont rapidement diminués (Leist *et al.,* 1997). *In vivo*, dans les conditions pathologiques, l'apoptose et la nécrose coexistent (Leist *et al.,* 1995). De plus, les niveaux d'ATP intracellulaires sont rapidement dissipés dans la nécrose, mais pas dans l'apoptose (Ankarcrona *et al.,* 1994). On peut ainsi dire que l'ATP est un composé essentiel dans l'orientation de la cellule vers la voie apoptotique ou la voie nécrotique. Cependant, certains évènements apoptotiques, comme la fragmentation de l'ADN, ne nécessitent aucune source d'énergie, contrairement au phénomène de condensation nucléaire par exemple (Kass *et al.,* 1996).

Caractéristique	Nécrose	Apoptose
Conditions de survenue	brutale	programmée
Mode	passif	actif (ATP dépendante)
Vitesse de déroulement	rapide	lente
Cicatrisation	groupe de cellules	cellules isolées
Incidence	Pathologique : ischémie sévère, hyperthermie sévère, hypoxie, exposition à des toxines, rupture des membranes cellulaires par le complément.	Physiologique : morphogenèse, homéostasie du tissu, involution, métamorphose. Pathologique : cancer, radiations ionisantes, hyperthermie moyenne, immunité cellulaire
Morphologie	rupture de la membrane cellulaire et désintégration des organites intracellulaires, inflammation due au relargage du contenu intracellulaire, phagocytose des débris cellulaires par les monocytes	margination de la chromatine et condensation du cytoplasme, fragmentation en corps apoptotiques sans relargage du contenu intracellulaire, phagocytose des corps apoptotiques par les cellules voisines
Lyse de la membrane plasmique	première étape	dernière étape
Hydrolyse de l'ADN	dernière étape	première étape
Volume cellulaire	augmentée	diminuée
Densité cellulaire	diminuée	augmentée
Concentration calcique	diminuée	augmentée
Organites intracellulaires	lysés	"intacts"

Tableau 4 : Aspects cellulaires de l'apoptose : apoptose vs necrose.

Parallèlement à ces manifestations morphologiques, des mécanismes moléculaires majeurs vont se dérouler. Ces mécanismes peuvent être regroupés en trois phases : la phase d'initiation, la phase d'exécution et la phase de dégradation. Ces mécanismes seront décrits ultérieurement dans ce manuscrit.

4. Physiologie de la mort cellulaire.

Le développement et le maintien des systèmes biologiques multicellulaires dépend d'un jeu sophistiqué entre les cellules formant l'organisme et implique même un comportement altruiste des cellules individuelles en faveur de l'organisme entier. Au cours du développement, de nombreux types de cellules sont produits en excès puis éventuellement certaines meurent par apoptose, contribuant ainsi à la sculpture de nombreux organes et tissus (Meier *et al.,* 2000). Cette capacité d'induire le suicide des cellules surnuméraires, mal placées ou endommagées avec une haute spécificité et efficacité est essentielle pour la construction, le maintien et la réparation des tissus. Mais la mort cellulaire ne se limite pas à la période embryonnaire et intervient tout au long de la vie d'un l'organisme, de sa naissance à sa mort. Les cellules d'un organisme adulte subissent constamment cette mort cellulaire physiologique qui doit être coordonnée avec la prolifération cellulaire afin de maintenir l'homéostasie cellulaire. En effet, dans l'organisme humain adulte, environ 100 000 cellules sont produites par mitose chaque seconde et un nombre similaire meurt par apoptose (Vaux et Korsmeyer, 1999).

Un exemple particulièrement frappant de l'implication de la mort cellulaire programmée dans le développement animal est la formation des doigts par mort cellulaire massive du tissu mésenchymateux interdigital (Zuzarte-Luis et Hurle, 2002). Un autre exemple est le développement des organes reproducteurs (Meier *et al.,* 2000).

L'apoptose participe également à la construction de nos deux organes de régulation les plus complexes, notre cerveau et notre système immunitaire. La mise en place du réseau synaptique entre les neurones dépend d'un contrôle dynamique et séquentiel de la vie et de la mort. Une fois que le cablage des synapses est établi, la survie des neurones dépend de la capacité de ces connexions à faire preuve de leur fonctionnalité ; l'absence de circulation d'information nerveuse à travers une synapse entraîne l'autodestruction des neurones qui la composent. En quelques jours, plus de la moitié des neurones du système nerveux central et périphérique initialement formés vont mourir par apoptose. Disparaissent ainsi les neurones dits « inutiles » ou « dangereux ». Le contrôle de la vie et de la mort cellulaire par des signaux de l'environnement joue un rôle dans ces signaux d'auto-organisation, sélectionnant parmi toutes les interactions neuronales initialement possibles, celles qui réussissent à faire preuve de leur capacité à fonctionner (Flanagan, 1999 ; Verhage *et al.,* 2000). Ce sont des mécanismes semblables qui

permettent la sculpture et la complexité de notre système immunitaire. La majorité des lymphocytes meurt par apoptose soit au cours des évènements de réarrangements génétiques lors de la formation du récepteur antigène, soit lors de la sélection négative ou en périphérie. Ainsi, remarquablement, un pool de cellules hautement efficaces et fonctionnelles est maintenu alors que les cellules immunitaires auto-réactives sont éliminées, ce qui permet de garder un nombre relativement constant de lymphocytes (Rathmell et Thompson, 2002).

Tous ces processus qui impliquent l'apoptose montrent l'importance biologique et l'étendu de l'apoptose : le développement, la différentiation, la prolifération/l'homéostasie, la régulation et le fonctionnement du système immunitaire et l'élimination des cellules défectueuses et potentiellement dangereuses. C'est pourquoi, tout dysfonctionnement ou dérégulation du programme apoptotique conduit à toute une variété de pathologies. Des défauts de l'apoptose peuvent conduire à des cancers, des maladies auto-immunes et des infections virales, alors que les maladies neurodégénératives, le SIDA ou les ischémies sont causés ou favorisés par une apoptose excessive (Fadeel *et al.,* 1999c). Les pathologies liées à l'apoptose ainsi que les stratégies thérapeutiques mises en place seront discutées ultérieurement dans ce manuscrit (cf § **III**).

5. Les principales voies de l'apoptose.

Il existe aujourd'hui deux voies principales de signalisation aboutissant à la mort cellulaire par apoptose (figure 4). La première, appelée voie intrinsèque, met en jeu la mitochondrie qui occupe une place centrale dans les mécanismes de l'apoptose. La deuxième voie est initiée à la surface de la cellule par des récepteurs membranaires, c'est la voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort pour laquelle il a été définit trois types cellulaires : (i) les cellules de types I ou la quantité de caspase 8 activée est suffisante pour induire l'activation directe des caspases effectrices et déclencher l'apoptose ; (ii) les cellules de type II, pour lesquelles la faible activation de la caspase 8 ne permet pas de déclencher directement la cascade de caspases, mais permet le clivage d'une protéine de la famille Bcl-2, Bid, permettant le déclenchement de l'apoptose à travers la voie mitochondriale ; (iii) les cellules de type mixte I et II où Bid fournit le lien et l'intégration entre les deux voies. Ces deux voies de signalisation aboutissent toutes deux à l'activation des caspases,

famille de protéases ayant un rôle clé dans l'apoptose (discuté § **I - 6**). Aujourd'hui, d'autres voies de signalisation s'ajoutent à celles précédemment décrites : la voie indépendante des caspases (discuté § **I – 6. 1. 7**.) met en jeu une protéine mitochondriale appelée AIF (Apoptosis Inducing Factor). Et, outre la mitochondrie, le réticulum endoplasmique apparaît comme un compartiment cellulaire déclencheur de l'apoptose en cas de stress. Par souci de concision, je ne discuterais pas de ce dernier point dans ce manuscrit.

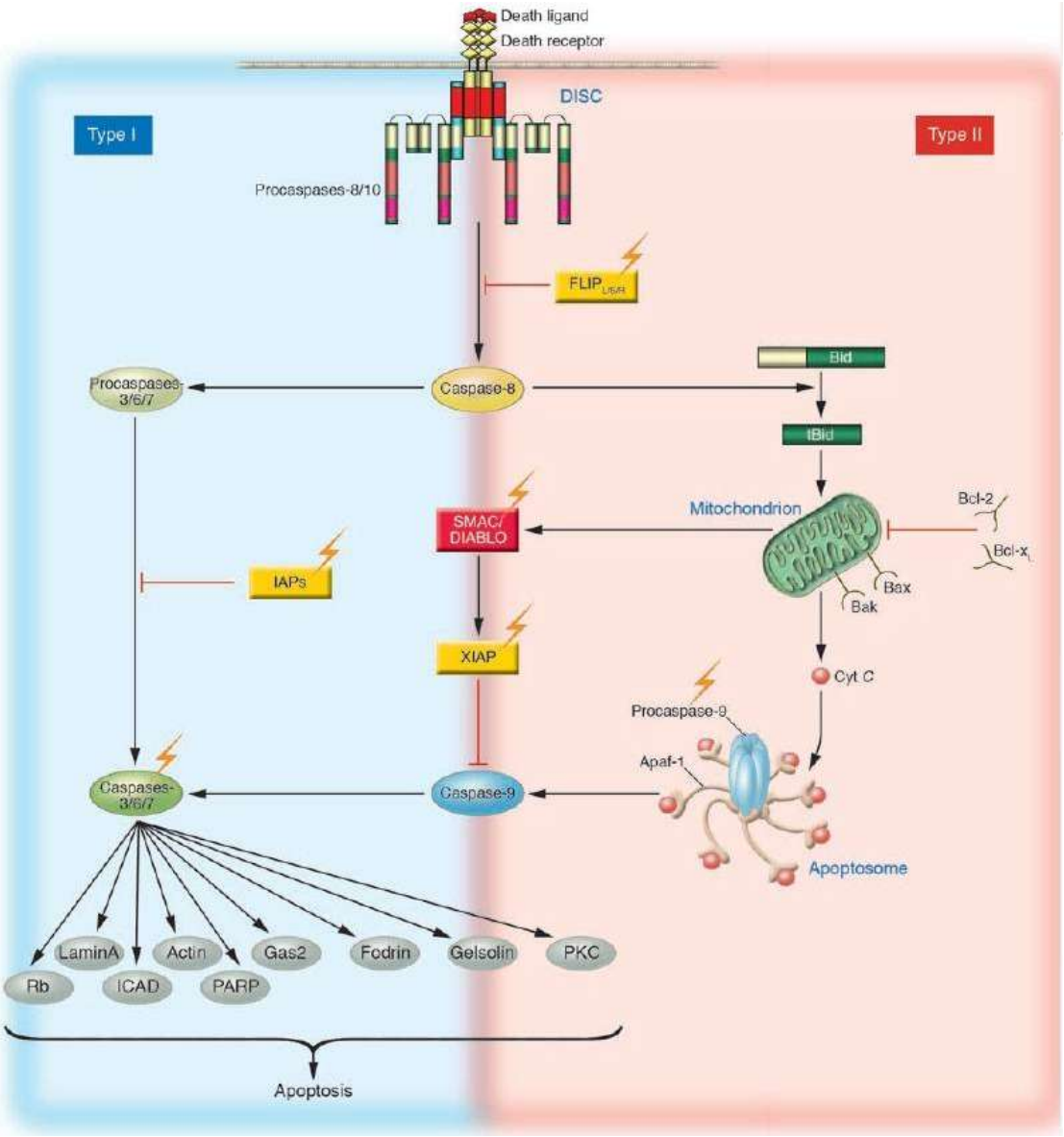


Figure 4 : Les deux voies principales de l'apoptose et les différents mode de régulation de la cascade d'activation des caspases (figure tirée de Lavrik *et al.,* 2005).

5. 1. Modèle triphasique.

Au niveau moléculaire, le processus apoptotique peut être divisé en trois étapes (figure 5) : (i) la phase d'initiation ou d'activation qui peut se faire par des voies afférentes très diverses et qui correspond à la réponse de la cellule à une modification des paramètres physiologiques ou biochimiques normaux ; (ii) la phase de décision ou d'engagement confrontant des mécanismes pro- et anti-apoptotiques déclenchés en parallèle par la cellule ; (iii) et enfin la phase d'exécution ou dégradation, commune à toutes les formes d'apoptose, qui a lieu en cas d'échec de restauration des fonctions cellulaires et qui aboutit à la destruction de la cellule.

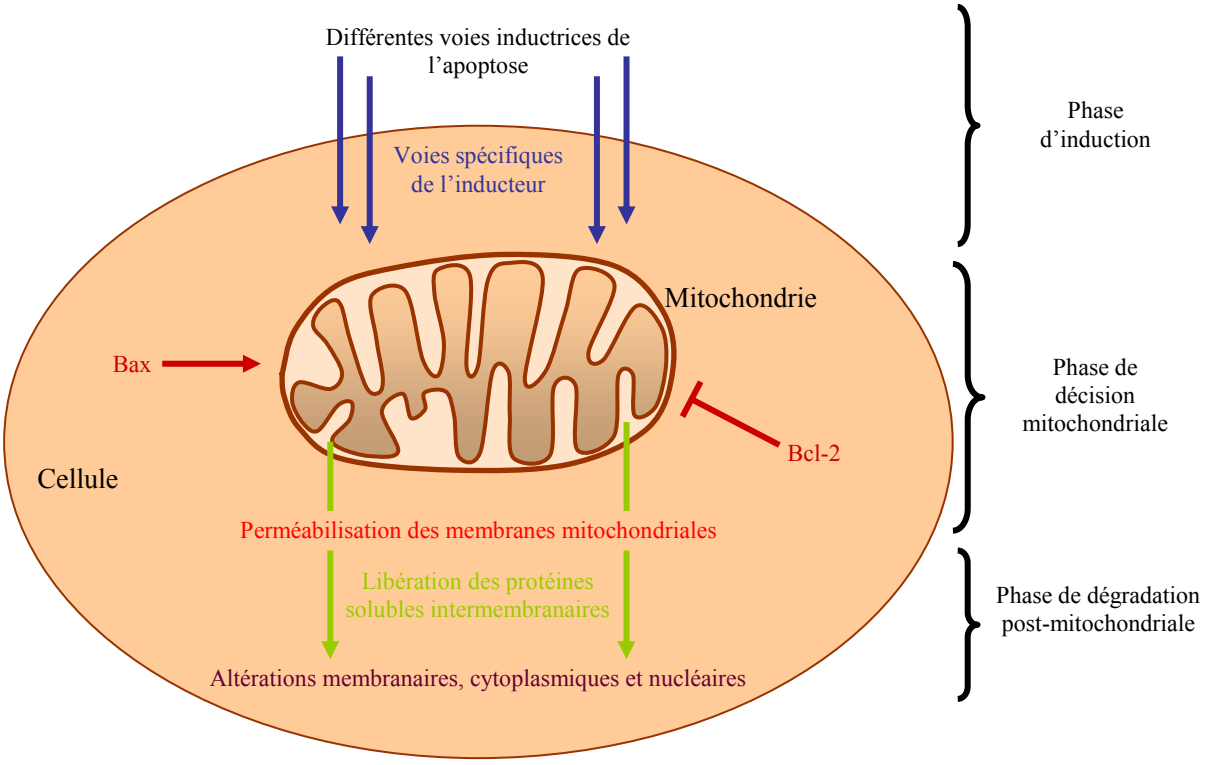


Figure 5 : Modèle apoptotique impliquant la mitochondrie. Certains auteurs, comme Kroemer et coll. (1998b), décrivent la mitochondrie comme le centre des phénomènes apoptotiques qui fonctionnent selon un modèle triphasique avec **une phase d'initiation** au cours de laquelle les signaux inducteurs d'apoptose convergent vers la mitochondrie, **une phase de décision** contrôlée par les membres de la famille Bcl-2 entraînant la perméabilisation des membranes mitochondriales et la libération de facteurs apoptogènes et enfin **une phase de dégradation** mettant en jeu les caspases et DNases qui dégraderont de nombreux constituants cellulaires (Green et Kroemer, 1998).

5. 1. 1. La phase d'initiation.

Cette phase prend des formes extrêmement variées en fonction du type de stress auquel la cellule est confrontée. On peut cependant distinguer deux grandes causes d'initiation du programme de mort : d'une part, l'altération des fonctions cellulaires ou la modification de l'environnement normal de la cellule (voie intrinsèque), d'autre part, la réception d'un signal de mort (voie extrinsèque) (voir § **I – 5. 1.** et **I – 5. 2.**). Ces inducteurs de l'apoptose incluent les signaux provenant de la cellule elle-même tels que la présence de mutations dans l'ADN, le stress oxydatif, l'hypoxie et des signaux provenant de l'environnement cellulaire tels que le tarissement en facteurs de croissance, les contacts intercellulaires ou la fixation d'hormones spécifiques sur des récepteurs membranaires ou nucléaires, ou encore l'exposition à des agents chimiques (drogues) ou physiques (UV, radiations…). Bien que divers stimuli n'activent pas forcément les mêmes cascades de réactions, et ne mobilisent pas le même programme génétique, certains protagonistes et certaines étapes clés sont communs à l'ensemble de ces voies.

5. 1. 2. La phase de décision.

Toutes les cellules ne sont pas également sensibles à un agent apoptogène mais réagissent en fonction de l'ensemble des signaux reçus de leur environnement afin de décider entre les options de vie et de mort. Plus précisément, la destinée d'une cellule dépendra des perturbations de l'équilibre établi entre d'une part les voies de survie et de mort cellulaires, et d'autre part entre les éléments activateurs et inhibiteurs de chacune de ces voies. Finalement, il apparaît que l'acquisition du phénotype apoptotique résulte de l'activation d'un ensemble de voies de signalisation intracellulaire interconnectées et hautement régulées et qu'il est difficile d'établir des classifications. Cependant, dans un but de clarification et en respectant les données de la littérature, il a été établi que d'une façon générale, la cascade apoptotique se réalise selon deux voies majeures de signalisation intracellulaire, la voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort et la voie intrinsèque ou voie mitochondriale (Ashe et Berry, 2003).

5. 1. 3. La phase d'exécution.

Cette phase consiste, une fois prise la décision en faveur de l'apoptose, en l'accomplissement proprement dit des modifications cellulaires liées au programme apoptotique. Malgré la diversité des stimuli et des voies inductrices de l'apoptose, cette phase finale est commune et irréversible et nécessite l'activation des caspases exécutrices. Une fois activées, les caspases ont pour cibles des protéines très variées, mais elles agissent principalement pour effectuer cinq actions : tout d'abord elles rendent inefficace les processus nécessaires pour préserver l'homéostasie cellulaire et la réparation. Puis les caspases provoquent un arrêt du cycle cellulaire et inactivent les inhibiteurs de l'apoptose. Enfin elles activent les enzymes impliquées dans la destruction des composés cellulaires ou elles dégradent directement les composants responsables du maintien de l'architecture cellulaire (PARP, DFF45, les lamines, la β-caténine ou encore l'actine) (Earnshaw *et al.,* 1999).

5. 2. La voie extrinsèque.

La voie extrinsèque est initiée lors de l'activation des récepteurs de mort suite à la fixation spécifique de leur ligand (figure 6). Une fois stimulés, ces récepteurs induisent l'activation des caspases. Cette voie d'activation est impliquée dans l'élimination des cellules potentiellement dangereuses pour l'organisme et notamment les lymphocytes autoréactifs.

Les récepteurs de mort appartiennent à la superfamille des récepteurs au TNF (tumor necrosis factor) [TNF-R] et au NGF (nerve growth factor) [NGF-R] (Nagata, 1997) et correspondent à des récepteurs transmembranaires de type I caractérisés par la présence de deux à quatre domaines riches en cystéine (CRD, cystein rich domain), impliquées dans la liaison du ligand, au niveau extracellulaire et d'un domaine de mort (DD, death domain), crucial pour la transduction du signal apoptotique, au niveau intracellulaire (Tartaglia *et al.,* 1993; Chaudhary *et al.,* 1997; Nagata, 1997). Le DD a été conservé au cours de l'évolution. Ainsi un domaine homologue est retrouvé dans le produit du gène Reaper de drosophile. Reaper est impliqué dans la régulation de la mort cellulaire programmée au cours de l'embryogenèse normale chez la drosophile (Golstein *et al.,* 1995). Les TNF-R peuvent promouvoir, selon le contexte cellulaire, soit la survie, soit la mort soit les deux. Les récepteurs suivant : CD27 (Camerini *et al.,* 1991), CD30 (Durkop *et al.,*

1992), CD40 (Stamenkovic *et al.,* 1989), TNFR2 (Smith *et al.,* 1990), Ox40 (Mallett *et al.,* 1990), 4-1BB (Kwon et Weissman, 1989) et p75 NGFR (Nerve Growth Factor Receptor) (Johnson *et al.,* 1986) sont impliqués dans la survie cellulaire. Parmi les membres de la famille impliqués dans la mort cellulaire, il convient de citer CD95 (Fas/APO-1) (Itoh *et al.,* 1991; Oehm *et al.,* 1992), TNFR1 (Loetscher *et al.,* 1990; Schall *et al.,* 1990), DR3 (Chinnaiyan *et al.,* 1996a) /Wsl-1 (Kitson *et al.,* 1996), DR4 (Chaudhary *et al.,* 1997), DR5 (Chaudhary *et al.,* 1997) et DR6 (Pan *et al.,* 1998a). La mort induite par les membres de la famille du TNF-R conduit à l'activation des caspases et en est dépendante (Enari *et al.,* 1995 ; Longthorne et Williams, 1997). Parmi cette famille de récepteurs impliqués dans la mort cellulaire (TNFR1/CD120a, Fas/CD95/APO-1, DR3/APO-3/LARD/TRAMP/WSL1, DR4/TRAIL-R1/APO-2, DR5/TRAIL-R2/KILLER/TRICK, etDR6) (Schulze-Osthoff *et al.,* 1998), deux ont été largement étudiés : le récepteur au TNF et le récepteur Fas (Sartorius *et al.,* 2001 ; Chen et Goeddel, 2002 ; Wajant, 2002).

Les ligands naturels de ces récepteurs appartiennent à la famille des ligands de mort composée d'une quinzaine de membres (dont le TNF, FasL/CD95L, CD30L, TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand), Lymphotoxine, etc…) (Nagata et Golstein, 1995). Ces ligands correspondent en majorité à des protéines transmembranaires de type II (extrêmité C-terminale du côté extracellulaire). Certaines de ces protéines, comme FasL et TNF, peuvent être solubilisées après une coupure générée par des métalloprotéases membranaires. Cependant, la forme membranaire semble plus active pour transduire le signal apoptotique (Hohlbaum *et al.,* 2000). Après fixation du ligand, le récepteur trimérique est activé, les différents DD intracellulaires interagissent probablement par des interactions électrostatiques et recrutent des protéines adaptatrices spécifiques. S'il semble bien établi, dans le cas de FasL, que la trimérisation des formes membranaires soit responsable de l'oligomérisation et de l'activation du récepteur Fas, le rôle des formes solubles est encore sujet à débat. De nombreuses études ont rapporté que des stress cellulaires pouvaient induire l'expression des ligands de mort, tel que FasL et donc induire l'apoptose (Kasibhatla *et al.,* 1998).

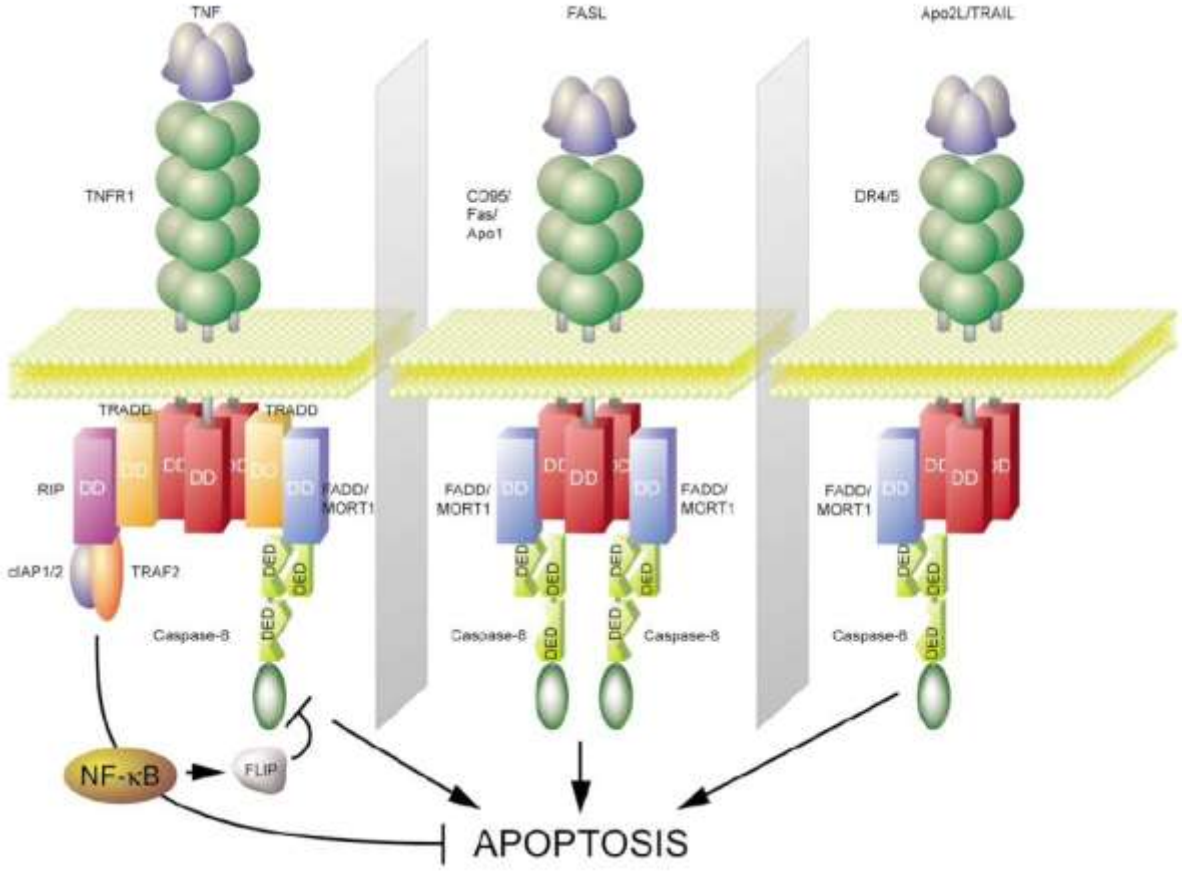


Figure 6 : La voie extrinsèque de l'apoptose (figure tirée de Danial et Korsmeyer, 2004). La liaison des ligands TNF, FasL et Apo2L/TRAIL sur leur récepteur respectif induit la trimérisation de ces récepteurs et la formation du DISC. Le DISC est composé de protéines adaptatrices de type FADD, possédant un DD (Death Domain) et un DED (Death effector Domain), qui peuvent s'associer par le DED à la caspase 8 ou FLICE et permettent ansi son activation et le déclenchement de la cascade de caspases en aval aboutissant à l'apoptose. Dans le cas du récepteur TNFR1, la liaison de TNF peut aussi induire la formation du complexe I constitué des protéines TRADD, RIP, cIAP1/2 et TRAF2. Ce complexe permet l'activation de NF-κB, facteur de transcription impliqué dans la survie de la cellule. Un modèle récent suggère que lorsque l'activation de NF-κB par le complexe I est suffisante, une protéine FLIP est exprimée afin d'inhiber la caspase 8 du complexe II (formé par TRADD, FADD et la caspase 8). Ainsi, dans ce modèle, il existe un équilibre entre les effets des deux complexes et le complexe II ne peut induire l'apoptose que lorsque l'activation de NF-κB par le complexe I est insuffisante.

5. 2. 1. La voie de signalisation activée par Fas/FasL.

Le récepteur Fas, qui représente le prototype des récepteurs de mort, est exprimé dans de nombreux tissus alors que le ligand FasL est exprimé presque exclusivement dans les lymphocytes T activés et les cellules NK (natural killer) (Nagata, 1997). Cette voie fortement régulée est largement impliquée dans la maturation et la régulation du système immunitaire de

par son rôle dans l'élimination (i) des cellules T auto-réactives ou mal différenciées, (ii) des lymphocytes périphériques après une réaction immunitaire, (iii) des cellules infectées par des virus, par les lymphocytes T cytotoxiques, (iv) des cellules cancéreuses. Quelques maladies semblent liées à des défauts au sein de cette voie : par exemple, les personnes atteintes du syndrôme lymphoprolifératif auto-immun (ALPS) présentent une mutation dans le DD du récepteur fas (Krammer, 2000).

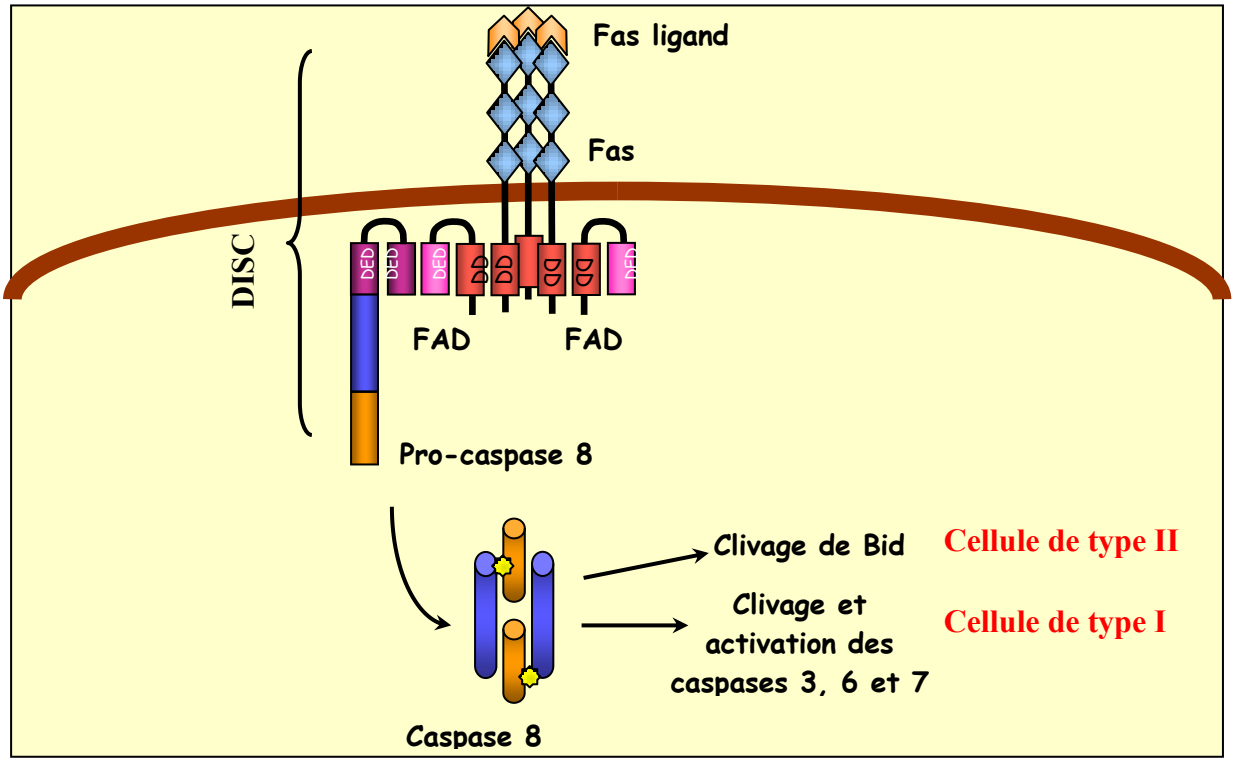


Figure 7 : Voie de signalisation activée par Fas/FasL.

Le couple Fas/FasL, au même titre que la paire granzyme B/perforine, joue un rôle prépondérant dans la cytotoxicité des lymphocytes T (LTc). Ces deux mécanismes coopèrent pour permettre l'élimination de la cellule cible par un processus d'apoptose (Cohen, 1991 ; Golstein *et al.,* 1991). Dans le cas du couple granzyme B/perforine, la perforine libérée à l'interface entre le LTc et la cellule cible forme un canal qui permet au granzyme B, une protéase à sérine possédant une spécificité de clivage identique à celle des caspases, de pénétrer dans la cellule cible afin d'activer directement les caspases effectrices et par voie de conséquence, d'induire l'apoptose (Heusel *et al.,* 1994).

La voie de signalisation induite par le complexe Fas/FasL (figure 7) s'active en quelques secondes et peut aboutir à la mort cellulaire en quelques heures. La liaison de trois molécules de FasL sur le récepteur Fas, préassemblé en homo-trimère provoque le recrutement des protéines adaptatrices cytosoliques FADD (Fas-associated death domain) ou MORT-1 par association de leur DD respectif (Chinnaiyan *et al.,* 1995). FADD contient aussi en N-terminal un domaine effecteur de mort (DED, death effector domain) qui est à son tour responsable de l'interaction avec le DED de la protéine FLICE (FADD-like ICE) nommée ultérieurement pro-caspase 8 (Boldin *et al.,* 1996; Fernandes-Alnemri *et al.,* 1996; Muzio *et al.,* 1996 ; Medema *et al.,* 1997). Une étude structurale récente décrit un modèle moléculaire d'interaction de FADD avec la pro-caspase 8 (Carrington *et al.,* 2006). Dans cette étude, un domaine de fixation spécifique de pro-caspase a été identifié au niveau du domaine DED de FADD et il a été suggéré que ce domaine interagirait avec un seul des deux domaines DED de la pro-caspase 8 de manière perpendiculaire. FADD peut aussi recruter la caspase 10 (Fernandes-Alnemri *et al.,* 1996 ; Vincenz et Dixit, 1997) par l'intermédiaire de ces DED et ainsi initier la cascade apoptotique (Hirata *et al.,* 1998). Le DED est nécessaire et suffisant pour induire l'apoptose. La transfection d'un module DED, comme Reaper par exemple, suffit à induire l'apoptose de cellules eucaryotes (Chinnaiyan *et al.,* 1996b). Le complexe formé par FasL, Fas, FADD et la pro-caspase 8 ou 10 (Kischkel *et al.,* 2001) constitue le complexe DISC (Death Inducing Signaling Complex) (Kischkel *et al.,* 1995) (figure 7). L'association des caspases initiatrices sur le récepteur activé *via* les protéines FADD permet leur rapprochement puis leur activation à travers un processus d'auto-catalyse induit par la proximité à la base de la libération de la forme active de l'enzyme dans le cytoplasme (Salvesen et Dixit, 1999). Selon le type cellulaire, il est possible à ce stade de distinguer deux voies de signalisation : dans les cellules de type I (thymocytes, cellules T périphériques…), la caspase 8 active directement les caspases exécutrices 3, 6 et 7 alors que dans les cellules de type II (cellules hépatiques), l'activation plus limitée de la caspase 8 génère l'activation d'une boucle d'amplification apoptotique passant par la mitochondrie (Scaffidi *et al.,* 1998 et 1999). Dans ce cas, le substrat cible de la caspase 8 fait partie des protéines de la famille Bcl-2 et correspond à une protéine à BH3 seulement nommée Bid (Li *et al.,* 1998). La forme tronquée de Bid, tBid, se relocalise à la membrane mitochondriale externe et participe, vraisemblablement à travers des interactions avec Bax (Desagher *et al.,* 1999 ; Eskes *et al.,* 2000) aux évènements mitochondriaux permettant d'aboutir à la libération rapide du cytochrome c de l'espace intermembranaire mitochondrial dans le cytoplasme (Luo *et al.,* 1998 ; Madesh *et al.,* 2002). Le cytochrome c participe alors, avec la pro-caspase initiatrice 9, Apaf-1 (équivalent de Ced-4 chez

Caenorhabditis elegans) et de l'ATP/dATP à la formation de l'apoptosome dont la fonction principale est d'activer la pro-caspase 9 puis la pro-caspase exécutrice 3 (Li *et al.,* 1997 ; Zou *et al.,* 1997 ; Hengartner, 1997).

Il existe des souris déficientes pour Fas : les souris *lpr*/*lpr* (lymphoprolifération). Elles souffrent d'une lymphoadénopathie, d'une splénomégalie et produisent une quantité accrue d'IgM et d'IgG (Nagata et Suda, 1995). Deux types de modifications du gène ont été mis en évidence. Le premier conduit à l'absence d'expression de Fas, le second consiste en une mutation ponctuelle dans le DD de Fas qui remplace l'isoleucine 225 par une asparagine et qui rend le récepteur incapable d'interagir avec la protéine FADD (Fas-associated Death Domain) et donc d'induire la mort. L'apoptose, médiée par Fas et TNFR1, n'est pas modifiée par la présence d'inhibiteur de la synthèse d'ARN ou de protéine (Itoh *et al.,* 1991; Yonehara *et al.,* 1989). De plus, des cellules énuclées peuvent enclencher un programme de mort cellulaire après stimulation du récepteur Fas (Schulze-Osthoff *et al.,* 1994). Ces résultats suggèrent que les différents protagonistes, nécessaires à l'induction de l'apoptose, sont constitutivement présents et que l'activation du récepteur par son ligand ne fait qu'induire l'association des protéines préexistantes nécessaires à la transmission du signal apoptotique.
Il existe des souris possédant un FasL non fonctionnel : les souris *gld* (*generalized lymphoproliferation disease*). Chez ces souris, la molécule FasL présente une mutation ponctuelle qui empêche sa liaison à son récepteur (Nagata et Suda, 1995). Le phénotype de ces souris est analogue à celui des souris *lpr*/*lpr*.

Il est à noter que plusieurs autres protéines sont directement associées à Fas ou influencent son activation. FAP-1, par exemple, est une phosphatase qui se lie au récepteur et inhibe l'apoptose selon un mécanisme toujours inconnu à ce jour (Sato *et al.,* 1995). L'expression sélective de FAP-1 dans les cellules T Th2 CD4+ pourrait expliquer la sensibilité moindre des cellules Th2 à l'apoptose induite par Fas (Zhang *et al.,* 1997). D'autres protéines telle que DAXX (Torii *et al.,* 1999), FLASH (Imai *et al.,* 1999) ou Toso (Hitoshi *et al.,* 1998) jouent un rôle dans la régulation de l'apoptose induite par les récepteurs de mort. FLASH fait partie intégrante du complexe moléculaire associé au récepteur Fas (DISC). Les auteurs ont montré qu'il était nécessaire à l'activation de la caspase 8 suite à une stimulation du récepteur (Imai *et al.,* 1999). DAXX se lie au domaine cytosolique du récepteur Fas et augmente la sensibilité des cellules à l'effet apoptogène de Fas. Cette augmentation résulte probablement d'une modulation de la transcription

de gènes impliqués dans l'activation des caspases et dans l'apoptose induite par Fas (Torii *et al.,* 1999). Toso est un membre de la super famille des immunoglobulines. Il est capable de bloquer spécifiquement l'apoptose induite par les TNF-R, dont Fas notamment, et joue probablement un rôle dans le devenir des cellules T (Hitoshi *et al.,* 1998). Les auteurs suggèrent que Toso puissent hétéroméríser avec d'autres protéines de surface et ainsi initier un signal anti-apoptotique.

5. 2. 2. La voie de signalisation activée par TNF/TNFR.

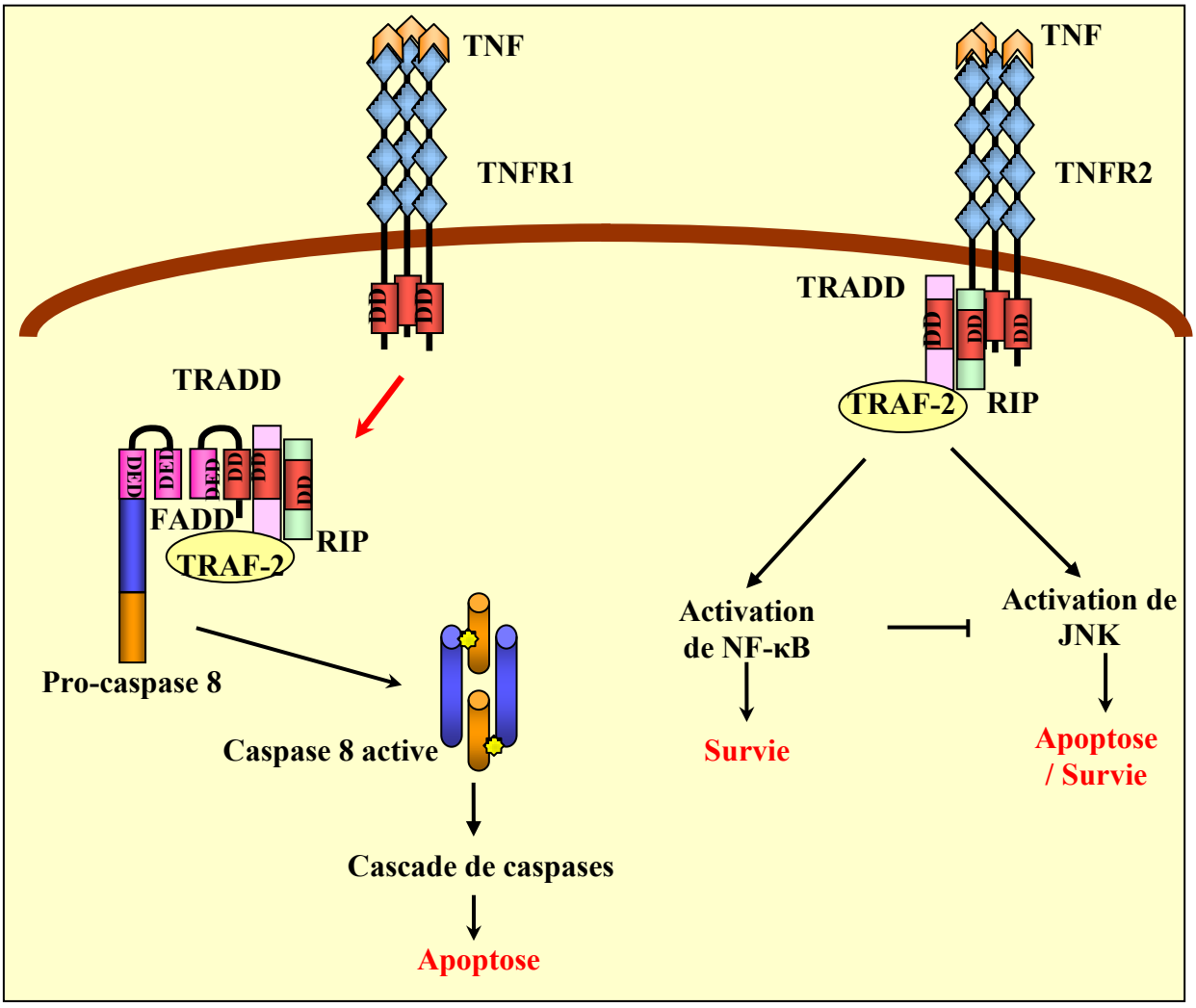


Figure 8 : Voies d'activation initiées par les TNFR.

Le TNF est une cytokine inflammatoire dont les effets pléiotropes passent par l'activation de deux types de récepteurs, TNFR1 et TNFR2. La voie de signalisation initiée par TNFR1 est impliquée dans la cytotoxicité alors que celle initiée par TNFR2 joue un rôle dans la prolifération

des cellules T (Tartaglia *et al.,* 1991). Le récepteur TNFR1, générant la majorité des effets biologiques dus au TNF, est exprimé de façon ubiquitaire alors que le TNF est produit uniquement par les cellules T et macrophages activés en réponse à une infection. Cette voie est impliquée dans la régulation du système immunitaire, la réponse inflammatoire et dans l'élimination des cellules cancéreuses. Ainsi, la production inappropriée de TNF semble être à l'origine de nombreux troubles tels que certains diabètes, cancers et maladies auto-immunes (arthrite rhumatoïde, sclérose…).

La liaison de l'homo-trimère TNF sur TNFR1 déclenche une série d'évènements intracellulaires qui aboutit selon les voies à l'activation des pro-caspases 2 / 8, ou des facteurs de transcription NF-κB et c-Jun (figure 8). Si l'activation des pro-caspases constitue le signal majoritaire, alors la cellule entrera en apoptose, et au contraire si l'activation de NF-κB prédomine, la cellule sera maintenue en vie. L'activation de la pro-caspase 8 se produit similairement à celle initiée par le complexe Fas/FasL. La différence principale réside dans le recrutement préalable de deux protéines adaptatrices, TRADD (TNF receptor-associated Death Domain) et FADD. TRADD est capable d'induire aussi bien l'activation de NF-κB que l'apoptose (Hsu *et al.,* 1995) en recrutant TRAF2 (TNFR-Associated Factor) ou FADD (Hsu *et al.,* 1996b). La liaison à TRAF2 aboutit à l'activation de NF-κB et de SAPK (Liu ZG *et al.,* 1996 ; Rothe *et al.,* 1995) alors que le recrutement de FADD enclenche l'activation des caspases.

L'activation de la pro-caspase 8 initiée par le complexe TNF/TNFR1 peut aboutir dans certaines conditions à l'activation de Bax (Hsu *et al.,* 1995 ; Sundararajan *et al.,* 2001). Cette voie peut être amplifiée par l'activation de la pro-caspase 2 à travers la formation d'un complexe de type TRADD/RIP/RAIDD (Shearwin-Whyatt *et al.,* 2000). TRADD interagit avec le DD de RIP (Receptor Interacting Protein), une serine/thréonine kinase qui peut induire selon les circonstances soit l'activation de NF-kB soit l'apoptose (Stanger *et al.,* 1995 ; Hsu *et al.,* 1996a). RIP est également associé à Fas (Hsu *et al.,* 1996a). RIP interagit avec RAIDD (Duan et Dixit, 1997) /CRADD (Ahmad *et al.,* 1997) qui lui-même lie directement la caspase 2 mais pas avec les caspases 1, 3, 4, 6, 7 ou 9 (Ahmad *et al.,* 1997; Duan et Dixit, 1997).

La caspase 2 active, qui semble pouvoir cliver Bid, induit alors l'apoptose par la boucle mitochondriale en permettant la libération des facteurs apoptogènes contenus dans l'espace intermembranaire (Guo *et al.,* 2002). L'implication de c-Jun dans l'apoptose est contreversée. Par contre, l'activation de NF-κB, dont les gènes cibles codent pour des inhibiteurs de caspases

(Wang CY *et al.,* 1998) et de la JNK (De Smaele *et al.,* 2001 ; Tang *et al.,* 2001), aurait plutôt un rôle inhibiteur de la mort cellulaire programmée en inhibant les voies TRADD/FADD/pro-caspase 8 et TRADD/TRAF2/JNK (Liu ZG *et al.,* 1996 ; Lin, 2003).

L'importance de FADD et son rôle central dans l'apoptose ont été renforcés par l'étude des souris invalidées pour ce gène. Les souris FADD$^{-/-}$ meurent au cours du développement embryonnaire. Elles présentent des problèmes cardiaques majeurs ainsi qu'une prédisposition aux hémorragies (Yeh *et al.,* 1998). Le phénotype de ces souris est similaire à celui des souris caspase 8$^{-/-}$ (cf § **I – 6. 1. 6.).** Les fibroblastes de souris FADD$^{-/-}$ sont insensibles à la surexpression de Fas, TNFR1 ou DR3 alors que des drogues anticancéreuses ainsi que l'expression des oncogènes c-Myc ou E-1A vont aboutir à leur élimination par apoptose. Certaines études suggèrent qu'il existe une connexion étroite entre prolifération cellulaire et apoptose. Ainsi la signalisation *via* FADD ne va pas exclusivement aboutir à la mort cellulaire mais aussi, selon les circonstances, à la survie et la prolifération (Newton *et al.,* 1998 ; Zhang J *et al.,* 1998).

5. 2. 3. Les autres récepteurs impliqués dans la voie extrinsèque.

Les récepteurs ubiquitaires DR4 et DR5 ressemblent structurellement et fonctionnellement au récepteur Fas. Contrairement à FasL, l'ARNm codant leur ligand, TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) est exprimé dans de nombreux tissus (Wiley *et al.,* 1995). Cependant, le complexe TRAIL/DR4 ou DR5 présente une toxicité sélective des cellules cancéreuses, conférée par la présence dans les cellules normales mais pas dans les cellules cencéreuses de récepteurs « leurres » (DcR1) inhibant la signalisation apoptotique (Pan *et al.,* 1997 ; Sheridan *et al.,* 1997). L'activation de l'apoptose induite par TRAIL passe par le recrutement de FADD et de la pro-caspase 8 et semble être médiée par la boucle mitochondriale (Kischkel *et al.,* 2000 ; Seol *et al.,* 2001) (figure 6).

Le récepteur DR3 possède une forte homologie de séquence avec TNFR1 et est capable, comme ce dernier, d'activer (i) l'apoptose par le biais d'interactions avec TRADD, FADD et la pro-caspase 8 et (ii) le facteur de transcription NF-κB *via* TRADD, TRAF2 et RIP (Marsters *et al.,* 1996). Contrairement au système TNFR1/TNF, ce récepteur est retrouvé essentiellement dans les tissus immunitaires comme la rate et le thymus et son ligand ApoL3, qui présente des similarités

avec le TNF, est exprimé de façon constituve dans de nombreux tissus, suggérant les rôles biologiques distincts de ces deux voies.

La signalisation médiée par DR6 possède aussi des similarités avec celle induite par TNFR1. Le ligand ainsi que les fonctions physiologiques de ce récepteur restent inconnus. Ce récepteur, exprimé dans de nombreux tissus, semble interagir avec TRADD et serait capable d'activer l'apoptose et les facteurs de transcriptions NF-κB et c-Jun (Pan *et al.,* 1998a).

5. 3. La voie intrinsèque ou voie mitochondriale.

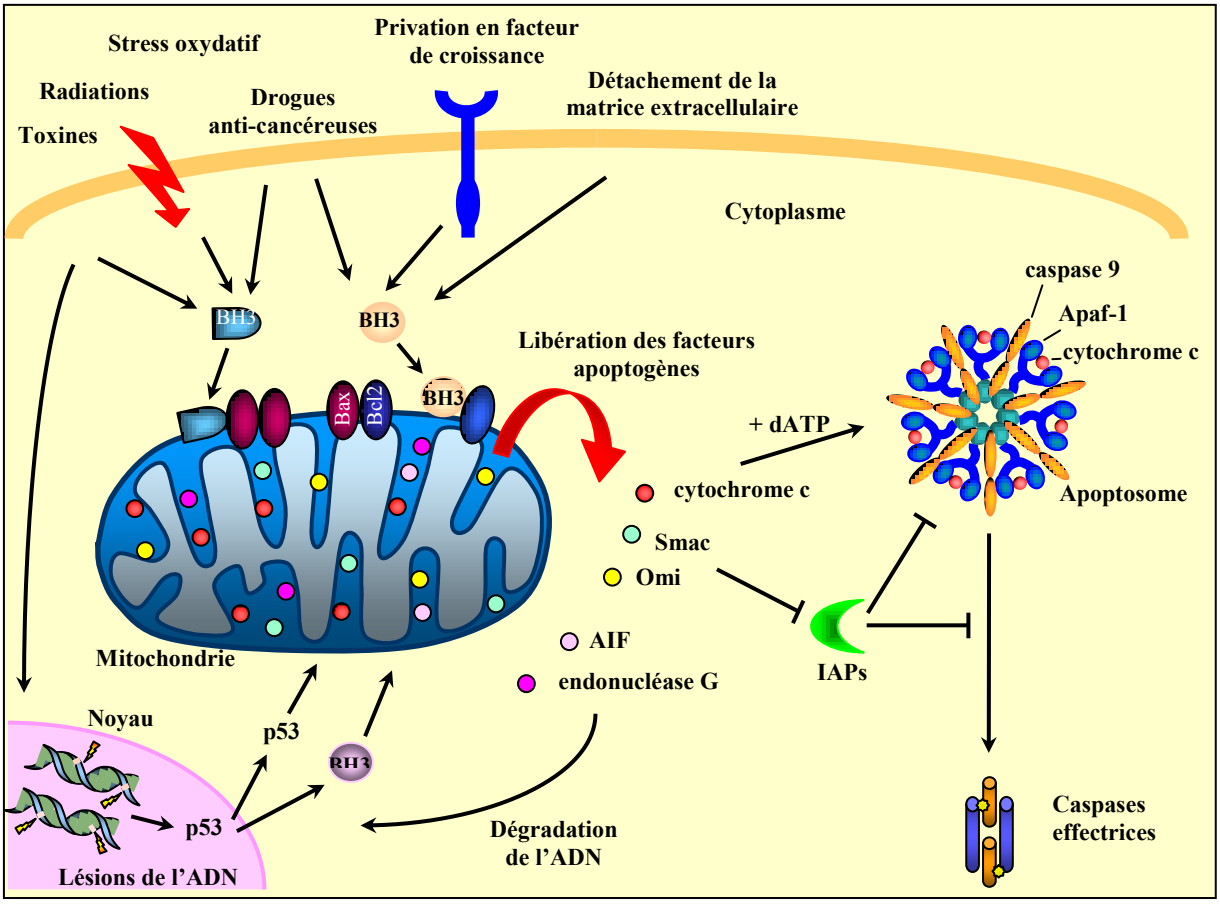


Figure 9 : La voie intrinsèque de l'apoptose.

Le rôle central des mitochondries dans le contrôle de l'apoptose a été mis en évidence par des études biochimiques montrant qu'un certain nombre de protéines mitochondriales étaient capables d'activer directement le programme apoptotique cellulaire (Liu X *et al.,* 1996) et par la localisation mitochondriale des protéines pro- et anti-apoptotiques Bax, Bcl-2 et Bcl-xL (Akao *et*

al., 1994 ; Krajewski *et al.,* 1993 ; Hsu *et al.,* 1997 ; Wolter *et al.,* 1997 ; Hsu et Youle, 1998). Ces organites, qui sont fondamentalement impliqués dans la survie cellulaire de par leur rôle dans le métabolisme énergétique cellulaire responsable de la synthèse d'ATP *via* la chaîne respiratoire, contiennent aussi un cocktail protéique détonnant nécessaire à l'activation et à l'amplification du processus apoptotique. De nombreux dommages intracellulaires (production de radicaux oxygénés, présence de mutation dans l'ADN génomique, inhibition d'enzymes clés…) générés lors de l'exposititon des cellules à des agents chimiques, physiques, bactériens, viraux ou lors de la privation en facteurs de croissance constituent des signaux pro-apoptotiques qui convergent vers et sensibilisent la mitochondrie (figure 9). Ceci aboutit à la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MME) (discutée au § **II - 3**) et par conséquent à la libération de facteurs solubles, normalement localisés dans l'espace intermembranaire mitochondrial, dans le cytosol. Certains de ces facteurs participent à l'activation des caspases soit par effet direct (cytochrome *c*) soit en neutralisant les inhibiteurs cytosoliques de celles-ci (Smac/Diablo, HtrA2/Omi), et d'autres favorisent la condensation et la fragmentation nucléaire (AIF, EndoG) (Ravagnan *et al.,* 2002 ; van Gurp *et al.,* 2003).

5. 3. 1. Libération de cytochrome c et formation de l'apoptosome.

Le cytochrome *c*, décrit pour la première fois en 1930 par Keilin, est une petite protéine de 12 kDa codée par le génome nucléaire, qui est produite sous forme d'un précurseur cytosolique inactif ou apocytochrome c. Une fois importée dans l'espace intermembranaire mitochondrial, l'apocytochrome *c*, qui est le substrat de la cytochrome c lyase catalysant l'attachement d'un groupement hème, se replie aussitôt en une structure plus compacte appelée holocytochrome *c* (ou cytochrome *c*). Le cytochrome c est un composant essentiel de la chaîne respiratoire et participe aux oxydations phosphorylantes comme transporteur d'électrons entre le complexe III (cytochrome *c* réductase) et le complexe IV (cytochrome *c* oxydase). Son implication dans l'apoptose n'a été mise en évidence qu'en 1996, au cours de travaux effectués par l'équipe de Wang X. montrant que dans un système acellulaire, l'holocytochrome *c* est nécessaire à l'activation de la caspase 3 (Liu X *et al.,* 1996). Ce résultat a été largement confirmé, notamment par le fait que la protéine anti-apoptotique Bcl-2 est capable de bloquer la libération de cytochrome *c* et l'activation des caspases (Kluck *et al.,* 1997 ; Yang *et al.,* 1997). En revanche, les inhibiteurs de caspases n'ont pas d'effet sur la libération de cytochrome *c* et ne provoquent

qu'un retard des signes morphologiques et biochimiques de l'apoptose. Cependant, certains travaux révèlent que l'inhibition de l'apoptose par Bcl-2 peut se faire en aval de la libération de cytochrome *c* par une inactivation, probablement indirecte, des caspases et supposant une interaction de type Bcl-2/Ced-4, jamais démontrée chez l'homme mais existant chez *Caenorhabditis elegans* (Rossé *et al.,* 1998 ; Zhivotovsky *et al.,* 1998). La libération de cytochrome *c*, une fois initiée, correspond à un processus coordonné, rapide (5 min) et total (Goldstein *et al.,* 2000 ; Martinou *et al.,* 2000) nécessitant deux étapes (Ott *et al.,* 2002) : (i) la solubilisation du cytochrome *c* plus ou moins fortement liée aux cardiolipines de la MMI dans l'espace intermembranaire mitochondriale ; (ii) la libération du cytochrome *c* dans le cytosol après perméabilisation de la MME par Bax. Par ailleurs, les nouvelles données structurales des mitochondries indiquent que 15 % du cytochrome *c* se situe dans l'espace intermembranaire étroit et que le reste se localise dans les crêtes (Frey et Mannella, 2000 ; D'Herde *et al.,* 2000). La libération de cytochrome *c* semble impliquer une voie dépendante des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Bax/Bak et les protéines à BH3 seulement) ainsi qu'une voie indépendante des protéines de la famille Bcl-2 consistant à un remodelage des crêtes de la MMI assurant la mobilisation des stocks de cytochrome *c* (Scorrano *et al.,* 2002 ; Scorrano et Korsmeyer, 2003). Les mécanismes de perméabilisation de la MME seront discutés ultérieurement dans ce manuscrit (cf § **II – 3**).

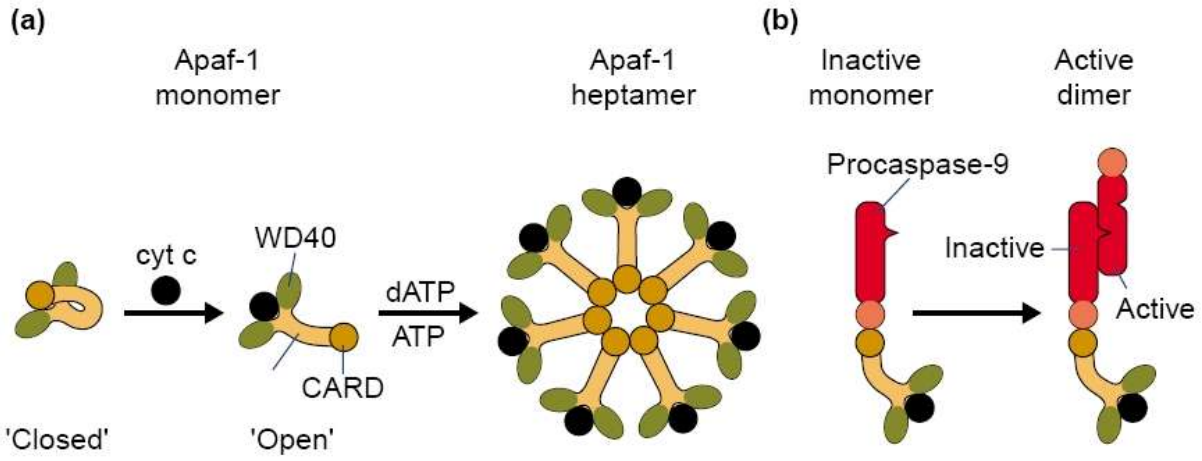


Figure 10 : Modèle d'activation d'Apaf-1 et de la procaspase 9 (figure tirée de Adams et Cory, 2002). (a) La fixation successive du cytochrome c (cyt c) et du dATP/ATP permet la conversion du monomère Apaf-1 « fermé » (closed) en son conformère « ouvert » (open) et à la formation de la plateforme heptamérique permettant l'assemblage à la procaspase 9. (b) On suppose qu'une procaspase 9 monomérique inactive recrute un autre monomère pour créer un dimère asymétrique avec un seul centre actif.

Une fois libéré dans le cytosol, le cytochrome *c* participe, par le biais de sa fixation à la protéine Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1), à la formation d'un complexe multiprotéique à haut poids moléculaire, l'Apoptosome (figure 10), capable d'activer successivement la pro-caspase 9 et la pro-caspase 3. La protéine Apaf-1 contient dans sa structure un domaine de recrutement des caspases (ou CARD), un domaine de liaison aux nucléotides ATP et dATP et de multiples motifs répétés WD-40 C-terminaux nécessaires pour la fixation du cytochrome *c* (Zou *et al.,* 1997 ; Li *et al.,* 1997). La liaison du cytochrome *c* sur Apaf-1 augmente l'affinité de ce dernier pour l'ATP et le dATP (Jiang *et al.,* 2000) et permet l'exposition d'un domaine d'oligomérisation similaire à la région N-terminale de Ced-4 (Adrain *et al.,* 1999). L'oligomérisation du complexe Apaf-1/cytochrome *c*/ATP/dATP génère une plateforme heptamérique (Acehan *et al.,* 2002) et s'accompagne du recrutement de la pro-caspase 9 *via* le domaine CARD N-terminal d'Apaf-1 et la maturation de celle-ci s'effectue à l'intérieur de l'Apoptosome par un processus d'autocatalyse. Seule la caspase 9 liée à l'apoptosome clive efficacement la pro-caspase 3 (Rodriguez et Lazebnik, 1999), responsable de la phase effectrice de l'apoptose.

Je discuterais plus en détail de la protéine Apaf-1 et de l'Apoptosome ultérieurement dans ce manuscrit (cf § **I - 7**).

5. 3. 2. Rôle des protéines Smac/Diablo et HtrA2/Omi.

La formation de l'apoptosome n'est pas toujours suffisante pour engendrer l'activation de la cascade apoptotique, du fait que les caspases sont maintenues inactives par les IAP (Inhibitor of Apotosis Protein). Cependant, au cours du processus apoptotique mitochondrial, la perméabilisation de la MME permet de libérer deux facteurs, Smac/Diablo (Second mitochondrial activator of caspases/Direct IAPs binding protein with low pI) et HtrA2/Omi qui contribuent directement à l'activation des caspases par séquestration des IAP (Verhagen *et al.,* 2000 ; Du *et al.,* 2000 ; Hegde *et al.,* 2002 ; Suzuki *et al.,* 2001b). Ces deux protéines présentent cependant un profil de distribution tissulaire différent ; l'ARNm de Smac/Diablo est abondant dans le cœur, le foie, les reins et les testicules et est faiblement exprimé dans les muscles squelettiques, les poumons, le thymus et le cerveau alors que celui de HtrA2 est ubiquitaire (Verhagen *et al.,* 2000 ; Du *et al.,* 2000).

La protéine murine Smac et son orthologue humain Diablo sont exprimés dans la cellule sous la forme d'un précurseur de 29 kDa et sont importées dans l'espace intermembranaire mitochondrial grâce à leur séquence d'adressage N-terminale (55 acides aminés). Sous induction apoptotique, la forme mature de la protéine (23 kDa) obtenue après clivage du peptide signal est libérée dans le cytosol où elle interagit avec les domaines BIR de différents IAP (XIAP, c-IAP1, c-IAP-2, Survivin). Plus précisémment, les quatre premiers acides aminés de la protéine Smac/Diablo mature, Ala-Val-Pro-Ile reconnaissent une cavité hydrophobe exclusive soit dans le domaine BIR2 soit dans le domaine BIR3 de XIAP, respectivement responsables de l'inhibition des caspases 3, 7 et 9 (Wu *et al.,* 2000 ; Chai *et al.,* 2000). L'interaction avec le domaine BIR2 de XIAP nécessiterait la formation d'un homo-dimère de Smac/Diablo ce qui expliquerait la levée de l'inhibition spécifique vis-à-vis de la caspase 3, elle-même formant un homo-dimère (Rotonda *et al.,* 1996).

Plus récemment, des expériences utilisant XIAP comme appât ont permis de mettre en évidence une nouvelle protéine capable de lier cet inhibiteur. Cette protéine, nommée HtrA2/Omi apparteint à la famille des sérines protéases, et est homologue à la protéine bactérienne HtrA (High-temperature requirement). Des études phylogénétiques seraient même en faveur de l'origine endosymbiotique de cette protéine (Ameisen, 2002). Alors que chez les bactéries cette protéine est impliquée dans la thermo- et l'osmo-tolérance (Spiess *et al.,* 1999), dans les cellules de mammifères, elle semble impliquée dans la réponse au stress et dans le processus apoptotique (Gray *et al.,* 2000). De façon similaire à Smac/Diablo, HtrA2 est produite dans la cellule sous forme d'un précurseur inactif de 50 kDa, puis est transportée dans l'espace intermembranaire mitochondrial grâce à la présence d'une séquence d'import N-terminale qui sera ensuite clivée pour générer la forme active de l'enzyme (36 kDa). Après induction de l'apoptose, elle est libérée dans le cytosol où elle interagit avce les IAP (à l'exception de la Survivin) et facilite ainsi l'activation des caspases. L'interaction avecles IAP se fait *via* le motif reaper-like N-terminal, Ala-Val-Pro-Ser de HtrA2/Omi, motif similaire à celui trouvé en N-terminal de la protéine mature Smac/Diablo et des protéines pro-apoptotiques liant les D-IAP de Drosophile : Hid, Grim, Reaper et Sickle (Martins *et al.,* 2002 ; Suzuki *et al.,* 2001b ; Hedge *et al.,* 2002 ; Goyal *et al.,* 2000). HtrA2/Omi présente une affinité plus importante pour le domaine BIR2 de XIAP et donc agit plus efficacement pour lever l'inhibition de XIAP sur la caspase 3 (Verhagen *et al.,* 2002). En outre, HtrA2 est capable d'activer l'apoptose indépendamment des caspases *via* son domaine catalytique amino-terminal à activité sérine protéase (Suzuki *et al.,* 2001b ; Hegde *et al.,* 2002). Cette protéine possède en C-terminal un domaine PDZ généralement impliqué dans les

interactions protéine-protéine. Finalement, il semblerait que cette protéine ait une fonction double à travers d'une part son activité inhibitrice des IAP (caspase-dépendante) et d'autre part son activité sérine protéase (caspase-indépendante) responsable d'une mort cellulaire atypique (Suzuki *et al.,* 2001b).

5. 3. 3. Rôle des protéines AIF et EndoG.

Deux facteurs libérés au cours du processus de perméabilisation de la MME et nommés AIF (Apoptosis Inducing Factor) et EndoG (Endonucléase G) participent directement à la phase effectrice de l'apoptose en favorisant les évènement de fragmentation et de condensation nucléaire (Susin *et al.,* 1996 ; Li *et al.,* 2001).

Le gène AIF code pour une protéine de 67 kDa composée d'une séquence d'adressage mitochondriale N-terminale, d'un domaine espaceur central et d'une séquence C-terminale présentant de fortes similarités avec les oxydo-réductases bactériennes et portant deux séquences putatives d'adressage nucléaire. La structure tridimensionnelle de AIF a été récemment résolue (Mate *et al.,* 2002). Une fois importée dans l'espace intermembranaire mitochondrial, la séquence N-terminale est clivée, donnant naissance à la protéine mature de 57 kDa. Après une induction apoptotique, la flavoprotéine AIF se relocalise dans le cytosol puis dans le noyau où elle induit une condensation périphérique de la chromatine et une fragmentation de l'ADN en fragments de haut poids moléculaire (50 kDa) (Lorenzo *et al.,* 1999 ; Susin *et al.,* 1999b). En outre, l'AIF peut affecter la mitochondrie en induisant une chute du potentiel membranaire et une libération de cytochrome c (Ferri *et al.,* 2000 ; Susin *et al.,* 1999b). La redistribution de AIF peut être bloquée par la sur-expression de la protéine Bcl-2 (Susin *et al.,* 1999b) et les effets apoptotiques de l'AIF caspase-indépendants peuvent être inhibés par une interaction directe avec le facteur cellulaire Hsp70 (Heat shock protein 70) (Ravagnan *et al.,* 2001). En outre, AIF possède une activité oxydo-reductase qui ne semble pas être impliquée dans le pouvoir pro-apoptotique de la protéine (Miramar *et al.,* 2001). Les mécanismes précis par lesquels AIF exerce ses fonctions restent inconnus actuellement. Cependant, le clonage récent de l'homologue de l'AIF chez *C. elegans*, wah-1, et l'exploration des mécanismes par lesquels cet homologue médie l'apoptose suggèrent que AIF coopèrent avec EndoG pour promouvoir l'apoptose (Wang *et al.,* 2002). Les mécanismes de libération de l'AIF par la mitochondrie restent également non élucidés.

Cependant, quelques données suggèrent que les membres de la famille Bcl-2 réguleraient les flux d'AIF. En effet, la sur-expression de Bcl-2 dans de nombreux systèmes inhibe la libération mitochondriale de l'AIF et l'apoptose (Pardo *et al.,* 2001 ; Fulda *et al.,* 2002b ; Susin *et al.,* 1999b). En outre, la libération de l'AIF de la mitochondrie semble être associée avec le clivage de Bid (Basu *et al.,* 2002 ; Fulda *et al.,* 2002b). Par ailleurs, l'expression de Bax conduit à la libération de l'AIF à partir de la mitochondrie (Arnoult *et al.,* 2002), et dans les neurones, Bax induit une dépolarisation mitochondriale et la libération de l'AIF (Cregan *et al.,* 2002).

EndoG est une enzyme mitochondriale de 30 kDa codée par le génome nucléaire. Sa structure a été récemment caractérisée (Schafer *et al.,* 2004). Sa localisation et sa spécificité de substrat laissaient penser que cette protéine hautement conservée dans le règne des eucaryotes était impliquée dans la réplication du génome mitochondrial (Cote et Ruiz-Carrillo, 1993 ; Tiranti *et al.,* 1995). Récemment, il a été montré que l'EndoG se localise dans l'espace intermembranaire mitochondrial et qu'elle est libérée dans le cytosol au cours du processus apoptotique, remettant en cause la validité des premiers résultats. Une fois dans le cytosol, l'EndoG se relocalise dans le noyau et participe à la fragmentation du génome nucléaire de façon à générer tout d'abord des fragments d'ADN à haut poids moléculaire puis des unités nucléosomiques (van Loo *et al.,* 2001 ; Li *et al.,* 2001). De surcroît, elle coopérerait avec la DNase I et l'exonucléase III pour amplifier ce phénomène (Widlak *et al.,* 2001). Les protéines de la famille Bcl-2 semblent être impliquées dans la libération de l'EndoG. En effet, l'étude de Li et coll. (Li *et al.,* 2001) a montré que la libération de l'EndoG est consécutive au traitement des mitochondries isolées avec tBid. De plus, dans cette étude, des souris transgéniques pour Bcl-2 ne présentent pas de flux d'EndoG au niveau de leurs mitochondries. Enfin, au cours de l'apoptose induite par Fas, une libération d'EndoG se produit également (van Loo *et al.,* 2001).

Des études de spectrométrie de masse effectuées à partir de mitochondries traîtées par t-Bid révèlent qu'une douzaine de protéines seraient libérées lors de la perméabilisation de la MME (van Loo *et al.,* 2002a). Parmi celles-ci, on retrouverait les protéines citées précédemment ainsi que l'adénylate kinase 2, l'acyl-CoA binding protein et le facteur d'épissage PTB (polypyrimidine tract binding protein). Cependant, l'implication potentielle de ces protéines dans l'apoptose reste encore à être précisée. Quelques études démontrent même que les pro-caspases 2, 8 et 9 se redistribueraient dans l'espace intermembranaire mitochondrial et qu'elles seraient libérées en même temps que les autres facteurs (Susin *et al.,* 1999a ; Qin *et al.,* 2001), cependant ces résultats sont sujets à contreverse (van Loo *et al.,* 2002b).

5. 3. 4. Régulation de la voie mitochondriale.

Dans les cellules vivantes, la voie apoptotique mitochondriale est finement régulée par les membres de la famille Bcl-2 (discuté § **I - 8**). Cette famille de protéines, qui regroupe des protéines pro-apoptotiques (Bax, Bak, Bid, Bad, Bim…) et des protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1…) ayant la propriété de former des homo-dimères et des hétéro-dimères, régit, à travers l'évènement de perméabilisation de la MME, l'ultime décision de vie ou de mort cellulaire. Plus précisément, l'activation de Bax qui se traduit par sa relocalisation à la MME et sa multimérisation constitue une étape décisive de l'apoptose puisqu'elle précède l'évènement de libération de cytochrome c des mitochondries. Il s'avère en effet que la seule addition de Bax sur des mitochondries isolées suffit à provoquer la libération de cytochrome c (Jürgensmeier *et al.,* 1998). En outre, des études plus récentes montrent qu'au cours de l'apoptose, l'insertion mitochondriale de Bax génère simultanément la formation de complexes supramoléculaires composés de 6 à 8 monomères de Bax (Antonsson *et al.,* 2001) et que le processus de « relocalisation/multimérisation » de Bax induit par l'ouverture du PTP (pore de transition de perméabilité) semble responsable de la sortie du cytochrome c (De Giorgi *et al.,* 2002), connu comme point de non-retour de l'apoptose (Martinou et Green, 2001 ; von Ahsen *et al.,* 2000a, 2000b).

5. 4. Libération de cytochrome c : point de non-retour de l'apoptose ?

Une fois libérée de la mitochondrie vers le compartiment cytosolique, les protéines apoptogènes (comme le cytochrome *c*) participent à la formation de complexes avec des protéines cytosoliques comme Apaf-1 (formation de l'Apoptosome), qui ensuite induisent ou lèvent l'inhibition de la cascade d'activation protéolytique des caspases (Adams, 2003). La libération de cytochrome *c* et l'activation des caspases sont des étapes cruciales pour le déroulement du processus apoptotique et il a été ainsi postulé que la libération du cytochrome c dans le cytoplasme des cellules est le point de non-retour du processus apoptotique (Martinou et Green, 2001 ; von Ahsen *et al.,* 2000a, 2000b). Cependant, une étude récente montre la présence constitutive de cytochrome *c* dans le cytoplasme de cellules non apoptotiques (Oliver *et al.,* 2005), suggérant que la libération de cytochrome *c* est compatible avec la préservation de l'intégrité membranaire et la fonction de la

mitochondrie. En effet, des expériences de fractionnement cellulaire et de microscopie confocale montrent la présence de cytochrome *c* non seulement au niveau des mitochondries mais aussi dans le cytosol de cellules de leucémie K562/ADR exprimant la P-gp (glycoprotéine P) en absence de tout signe apoptotique. Cette résistance à l'apoptose des cellules K562/ADR semble être due à une faible expression d'Apaf-1 et par conséquent une absence d'activation de la caspase 3. Des phénotypes similaires ont été observés dans d'autres lignées cellulaire de leucémie qui survivent et prolifèrent malgré la présence de cytochrome c cytosolique (Chen *et al.,* 1998). D'autres lignées leucémiques avec un phénotype MDR (Multi Drug Resistance) ont développé des stratégies différentes de « résistance » post-mitochondriale : augmentation de l'expression de XIAP (X chromosome-linked Inhibitor of Apoptosis Protein) (Campone *et al.,* 2001) ou mutation inhibant l'activité de la caspase 3 (Pelletier *et al.,* 2004).

6. Les principaux acteurs moléculaires de l'apoptose.

6. 1. Les caspases.

La première mise en évidence du rôle primordial des protéases à cystéine ou caspases (cysteinyl aspartate-specific proteases ou cystéine asparte protéases) dans l'apoptose provient de l'identification puis du clonage du gène pro-apoptotique *ced-3* chez le nématode *Caenorhabditis elegans*. Le gène homologue chez les mammifères (Yuan *et al.,* 1993) code pour la protéine ICE (interleukin-1 β converting enzyme) (Thornberry *et al.,* 1992), rebaptisée par la suite caspase-1 (Alnemri *et al.,* 1996). Ces protéases apoptogènes sont des protéases à cystéine qui possèdent une spécificité stricte de clivage de leurs substrats après un résidu d'acide aspartique. Cette spécificité de clivage n'est partagée qu'avec une seule autre protéase, le granzyme B (une sérine protéase présente dans les lymphocytes T cytotoxiques). A ce jour, 14 caspases différentes ont été identifiées, variables en fonction de leur poids moléculaires : 32 à 55 kDa ; à l'exception des caspases-11, -12 (murines) et -13 (bovine), elles existent toutes chez l'homme.

6. 1. 1. Nomenclature.

La nomenclature proposée par Alnemri et coll. (1996) regroupe désormais les protéases apoptogènes sous le nom de CASPASE (tableau 5). Le ***C*** représente la cystéine du centre actif (QA**C**xG) et ***aspase*** définit la spécificité stricte de clivage des substrats de cette famille de protéases après un acide aspartique. La protéine ICE, qui fut chronologiquement la première caspase caractérisée, a donc été tout naturellement renommée caspase 1.

Par la suite, l'analyse fonctionnelle des quatorze membres de cette famille a permis de distinguer deux classes de protéines : la classe 1, qui comprend les caspases 1, 4, 5, 11, 12 et 14, est impliquée dans les processus de maturations des cytokines (caspases inflammatoires), notamment dans le clivage protéolytique des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL1 et l'IL8 (Amarante-Mendes et Green, 1999), alors que la classe 2, comprenant les caspases 2, 3, 6, 7, 8, 9 et 10, est impliquée dans l'apoptose (caspases effectrices et initiatrices) (Thornberry et Lazebnik, 1998) (figure 11).

Nouveau nom	Ancien Nom	Site de clivage dans le zymogène	Substrat préférentiel	Possibilité d'auto-activation	Inhibée par		
					CrmA	p35	XIAP
Caspase 1	ICE	TPLD/S FEDD/A AVQD/N	YEVD/X WEHD/X	+	+++	+	-
Caspase 2	Ich-I_L NEDD2	DQQD/G EESD/A DNKD/G	VDVAD/X DEHD/X	+	-	+	-
Caspase 3	CPP32 Apopain	IETD/S ESMD/S	DMQD/X DEVD/X	+	-	+	+
Caspase 4	ICE_{rel}II Tx, Ich-2	WVRD/S LEED/A ?	LEVD/X (W/L)EHD/X	+		+	
Caspase 5	ICE_{rel}III, Ty	WVRD/S LEAD/S	(W/L)EHD/X				
Caspase 6	Mch2	DVVD/N TEVD/A TETD/A	VEID/N VEHD/X	+	-	+	-
Caspase 7	Mch3, CMH-1, ICE-LAP3	IQAD/D DSVD/A	DEVD/X	+	-	+	+
Caspase 8	Mch5, FLICE, MACH	VETD/S LEMD/L REQD/S	IETD/X LETD/X	+	+	+	-
Caspase 9	Mch6, ICE- LAP6	PEPD/A DQLD/A	LEHD/X	+			+
Caspase 10	Mch4, FLICE-2	IEAD/A SQTD/V	IEAD/X	+		+	-
Caspase 11		?					
Caspase 12		?					
Caspase 13	ERICE	?					
Caspase 14	Viz	?					

Tableau 5 : Ancienne et nouvelle nomenclature des caspases. Le(s) site(s) de clivage dans le zymogène ansi que la séquence consensus des substrats préférentiels sont indiqués.

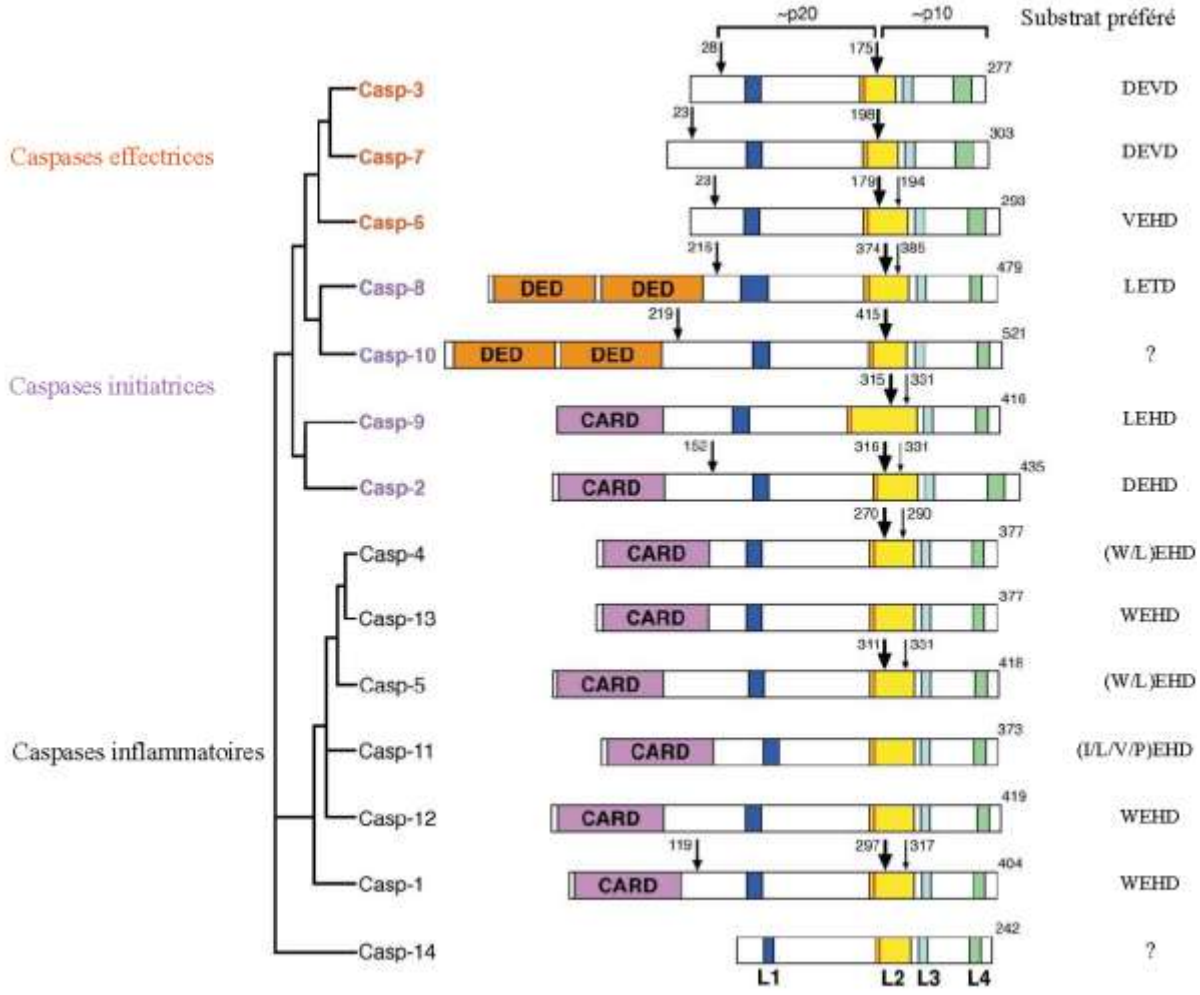


Figure 11 : Diagramme phylogénétique des caspases de mammifères (tiré de Shi, 2002). Toutes les caspases représentées sont d'origine humaine, sauf les caspases-11 et -12 (murines), et la caspase 13 (bovine). La position du premier site de clivage est indiquée par une grosse flèche, les sites secondaires sont indiqués par des flèches moyennes et petites. Contrairement aux autres protéases zymogènes, le clivage du prodomaine des caspases n'est pas indispensable à leur activité catalytique. Les quatre boucles (L1 à L4) de surface qui forment le sillon catalytique sont indiquées. Le résidu Cys catalytique est représenté par un trait rouge au début de la boucle L2. La séquence consensus du substrat préféré de chaque caspase est indiquée.

6. 1. 2. Structure des caspases.

Toutes les caspases ont une structure très conservée. Elles ont la propriété commune de présenter un fort pourcentage de similitude au niveau de leur structure primaire et tertiaire et de cliver leur substrat après une séquence tétrapeptidique, spécifique à chaque enzyme mais comportant toujours un résidu aspartate final (Thornberry et Lazebnik, 1998 ; Nicholson et Thornberry, 1997). Les caspases sont exprimées dans la cellule de façon constitutive et résident dans le

cytosol sous forme de pro-enzymes inactives ou zymogènes (de 30 à 50 kDa). Sous leur forme inactive (zymogène), ces enzymes sont constituées d'un pro-domaine N-terminal de taille variable, d'un domaine qui deviendra après clivage la grande sous-unité (de 17 à 21 kDa) portant le site catalytique et d'un domaine qui deviendra après clivage la petite sous-unité (de 10 à 14 kDa) (figure 11). Certains membres de la famille des caspases possèdent un domaine de liaison entre la grande et la petite sous-unité. Les pro-domaines sont variables, à la fois dans leur taille et dans leur séquence. Ainsi les caspases 3, 6 et 7 ont un petit pro-domaine (< 30 acides aminés) alors que les caspases 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12 et 13 possèdent un grand pro-domaine (> 100 acides aminés) (figure 11). Les caspases à petits pro-domaines sont souvent regroupées sous le nom de caspases effectrices et sont importantes dans la mise en œuvre des manifestations morphologiques de la mort cellulaire programmée *via* le clivage d'un certain nombre de protéines essentielles à la vie de la cellule (Nicholson, 1999 ; Earnshaw *et al.,* 1999) (tableau 6). Les caspases effectrices sont activées par des caspases dites initiatrices. L'activation des caspases initiatrices se situent en amont de la cascade de signalisation et ne participent pas directement à l'apparition des modifications morphologiques et biochimiques caractéristiques de l'apoptose. Les prodomaines semblent jouer un rôle dans les interactions protéines-protéines. Ainsi les prodomaines des caspases 8 et 10 contiennent des domaines DED (Death Effector Domain ou Domaine Effecteur de Mort) qui sont des structures permettant la liaison de la caspase aux molécules adaptatrices FADD (Boldin *et al.,* 1995; Chinnaiyan *et al.,* 1995) ou TRADD (Hsu *et al.,* 1995). Certaines autres caspases (caspases 1, 2, 4 et 9) possèdent un domaine CARD (Caspase Recruitment Domain ou Domaine de Recrutement des Caspases) (Hofmann *et al.,* 1997). Ces domaines CARD jouent un rôle dans l'interaction entre caspases ainsi qu'avec une grande variété de molécules adaptatrices ou régulatrices.

6. 1. 3. Activation des caspases.

La maturation de la pro-caspase à l'état de zymogène en une enzyme active nécessite deux clivages protéolytiques au niveau de liaison Asp-X. Ce clivage protéolytique est déclenché par l'action d'autres caspases ou du granzyme B ou de la caspase elle-même (Nicholson et Thornberry, 1997). Ces clivages successifs ont lieu de manière séquencielle : tout d'abord clivage entre la grande et la petite sous-unité (libérant la petite sous-unité du reste de la molécule) suivie de la libération du prodomaine (figure 12). La caspase active possède une structure tétramérique,

c'est à dire deux hétérodimères composés chacun de l'association étroite d'une grande sous-unité et d'une petite sous-unité, et comprenant donc deux sites catalytiques. La structure générale ainsi obtenue est $(p10/p20)_2$ (Walker *et al.,* 1994; Wilson *et al.,* 1994; Rotonda *et al.,* 1996). Certaines études ont décrit la possibilité qu'une sous-unité p10 issue d'un zymogène puisse s'associer avec la sous-unité p20 d'un autre zymogène durant la maturation des précurseurs (Walker *et al.,* 1994; Wilson *et al.,* 1994; Rotonda *et al.,* 1996).

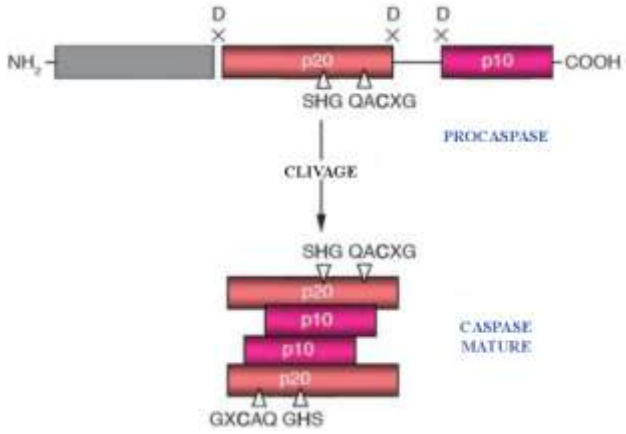


Figure 12 : Schéma d'activation d'une pro-caspase (figure tirée de Lavrik *et al.,* 2005). Le pro-domaine est représenté en gris. La pro-caspase est clivée au niveau des résidus Asp (D) spécifiques et le prodomaine est libéré. La caspase mature est composée d'un hétérotétramère $(p10p20)_2$. Les résidus impliqués dans la formation du centre actif sont indiqués.

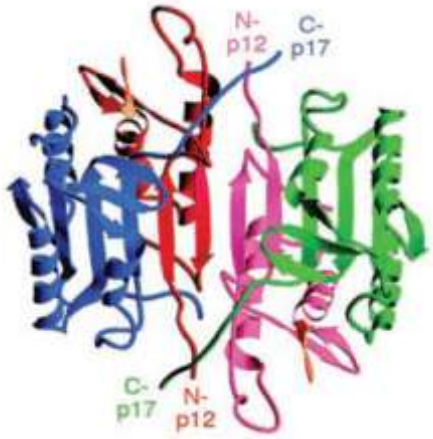


Figure 13 : Structure tridimensionnelle de la caspase 3 active (figure tirée de Lavrik *et al.,* 2005). Chaque hétérodimère est formé grâce à des interactions hydrophobes impliquant la formation de feuillets β parallèles, composés chacun de 6 brins β antiparallèles. Dans l'hétérotétramère, les 12 brins β des deux hétérodimères sont pris en sandwich entre des hélices α. Les extrémités N- et C-terminales des petites et grandes sous-unités de la protéase sont indiquées.

Il est à noter que certaines protéases n'ayant pas de spécificité pour un acide aspartique sont capables d'activer les zymogènes des caspases au moins *in vitro* (Zhou et Salvesen, 1997). Ce clivage intervient au niveau de sites alternatifs situés dans le segment de liaison entre la grande et la petite sous-unité.

Désormais, l'ensemble des études s'accordent à dire que l'unité fonctionnelle des caspases est un homodimère $(p10/p20)_2$, dont chaque monomère (p10/p20) comprend une petite sous-unité (p10) et une grande sous-unité (p20). L'homodimérisation est médiée par des interactions hydrophobes, avec six brins β antiparallèles de chaque sous-unité catalytique formant un feuillet contigu unique de 12 brins β. Quelques hélices α et de courts brins β sont localisés sur un autre côté du feuillet central, conférant une structure globulaire à l'ensemble. Les sites actifs, formés par les boucles saillantes de la plateforme sont localisées aux extrémités opposées du feuillet β (figure 13). Désormais, nous disposons d'informations structurales sur la caspase 1 (Walker et Sikorska, 1994 ; Wilson *et al.,* 1994), la caspase 3 (Mittl *et al.,* 1997 ; Rotonda *et al.,* 1996), la caspase 7 (Wei *et al.,* 2000), la caspase 8 (Blanchard *et al.,* 1999 ; Watt *et al.,* 1999) et la caspase 9 (Renatus *et al.,* 2001).

La majorité des études sur l'apoptose repose sur le fait que les précurseurs des caspases sont activés par clivage. Bien que ce soit le cas pour les caspases effectrices, de nombreuses études tendent vers un nouveau mécanisme d'activation des caspases initiatrices. Il s'agirait d'une dimérisation induite par rapprochement des pro-caspases, sans clivage nécessaire, appelé « modèle de proximité ». En effet, de nombreuses études ont révélé que le clivage n'est ni nécessaire, ni suffisant à l'activation des caspases initiatrices (Stennicke *et al.,* 1999 ; Srinivasula *et al.,* 1998, 2001a et 2002; Wang X, 2001 ; Martinon *et al.,* 2002 ; Chang *et al.,* 2003).

Les pro-formes des caspases initiatrices existent dans la cellule sous forme de monomères inactifs, qui requièrent alors une dimérisation pour atteindre leur conformation active, ce qui est totalement indépendant de leur clivage (figure 14) (Boatright *et al.,* 2003 ; Donepudi *et al.,* 2003 ; Stennicke *et al.,* 1999). Cette dimérisation se produirait *via* des complexes multiprotéiques au sein desquels la caspase serait recrutée grâce à son domaine N-terminal (DED ou CARD). Le complexe formé dépend alors du stimulus qui peut être apoptotique ou non. Parmi ces complexes multiprotéiques, nous pouvons citer le DISC (Chang *et al.,* 2003), l'Apoptosome (Wang J *et al.,* 2001), RIP2 (Receptor Interacting Protein 2) associée à d'autres protéines adaptatrices non définies (McCarthy *et al.,* 1998 ; Thome *et al.,* 1998) et l'Inflammosome (Martinon *et al.,* 2002).

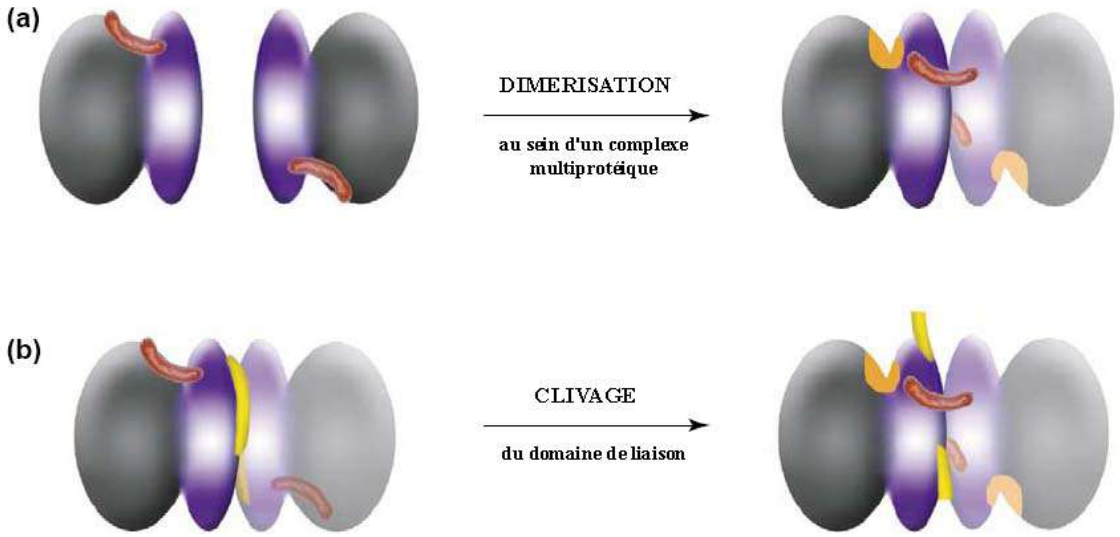


Figure 14 : Représentation schématique des deux mécanismes moléculaires d'activation des pro-caspases (figure tirée de Boatright et Salvesen, 2003). (a) Activation des caspases initiatrices. Les zymogènes des caspases initiatrices sont sous la forme de monomères inactifs et sont activés par dimérisation, permettant la translocation de la boucle d'activation (représentée par une saucisse rouge) dans la poche acceptrice du dimère voisin. Les sites actifs sont représentés en orange. (b) Activation des caspases exécutrices. Les zymogènes des caspases exécutrices existent sous la forme de dimères préformés et sont maintenus dans une conformation inactive par des encombrements stériques imposés par leur domaine de liaison (représenté par une banane jaune). Le clivage du domaine de liaison permet la translocation de la boucle d'activation, facilitant la formation du site actif. Notons que les processus d'activation, de translocation de la boucle d'activation sont conservés aussi bien pour les caspases initiatrices qu'exécutrices.

L'activation des caspases initiatrices réside donc dans le rapprochement des monomères inactifs pour former le dimère contenant alors un seul site actif (figure 15). L'auto-clivage qui en résulte ne serait qu'un évènement de stabilisation de ce dimère (Boatright *et al.,* 2003 ; Donepudi *et al.,* 2003). Le phénomène primordial serait donc l'oligomérisation au sein de complexes multiprotéiques *via* des interactions homotypiques avec des protéines adaptatrices. Contrairement aux caspases initiatrices et inflammatoires, les caspases effectrices existent dans le cytosol sous forme de dimères préformés inactifs (Boatright *et al.,* 2003 ; Shi, 2002) et sont activées par protéolyse par une caspase initiatrice ou par une autre protéase.

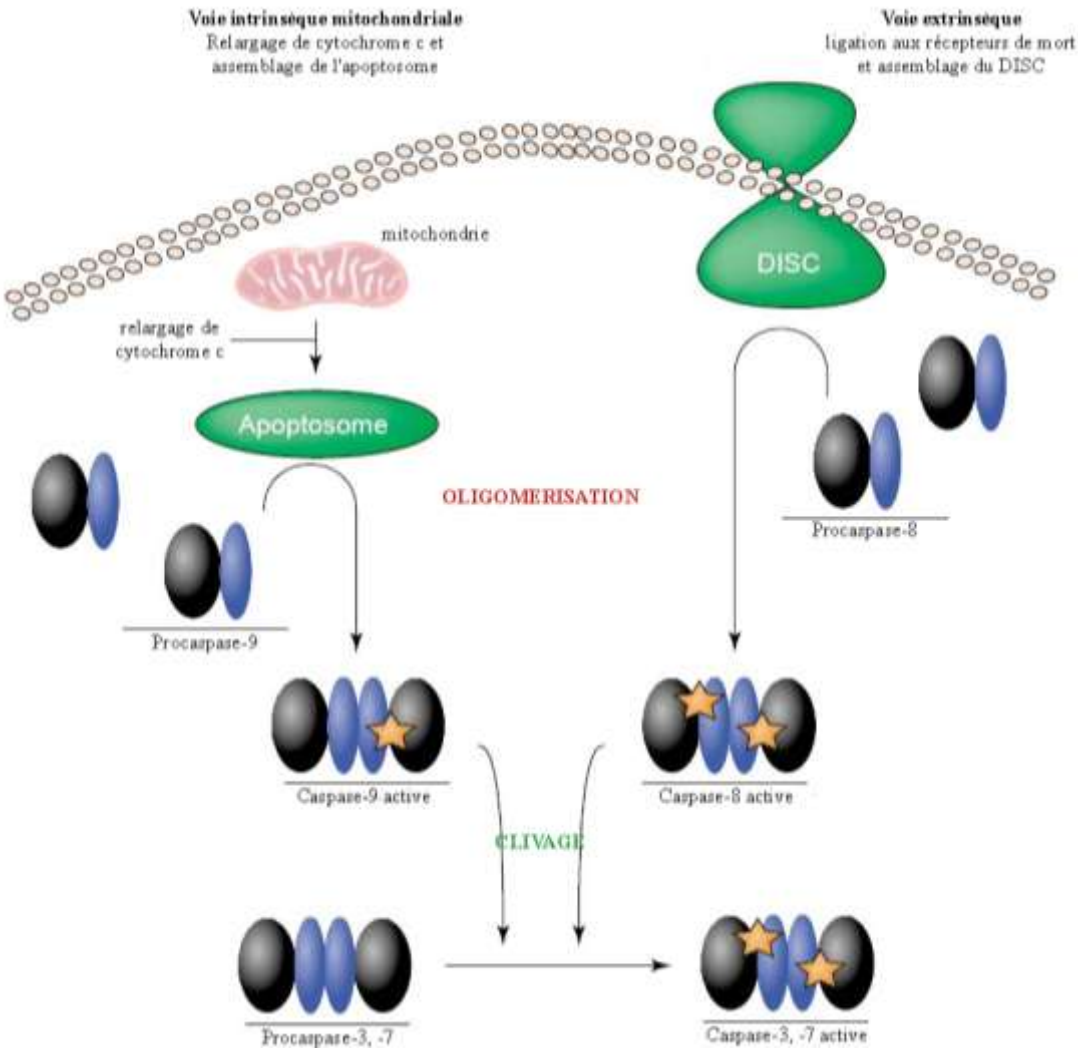


Figure 15 : Représentation schématique de l'activation des caspases au cours de l'apoptose (figure tirée de Boatright et Salvesen, 2003). Les caspases initiatrices existent dans la cellule sous forme de monomères inactifs. L'engagement des voies de mort intrinsèque ou extrinsèque conduisent à l'activation des caspases par dimérisation au sein de complexes multiprotéiques. La voie intrinsèque conduit à l'activation de la caspase 9 par l'apoptosome alors que la voie extrinsèque conduit à l'activation de la caspase 8 (et 10 au moins chez l'homme) au sein du DISC. Contrairement à la caspase 8, l'oligomérisation de la caspase 9 ne libèrerait qu'un seul site actif (représenté par une étoile orange). Les caspases exécutrices qui existent dans la cellule sous forme de dimères préformés inactifs, doivent être clivées par les caspases initiatrices pour être activées.

Le site actif des caspases présente des caractéristiques conservées. Le site catalytique de ces enzymes comprend un résidu cystéine (C) localisé au centre du motif QA**C**xG (où x = R, Q ou G). Le sillon de liaison du substrat est façonné par quatre boucles périphériques, nommées L1, L2, L3 et L4 (Shi, 2002) (figure 16).

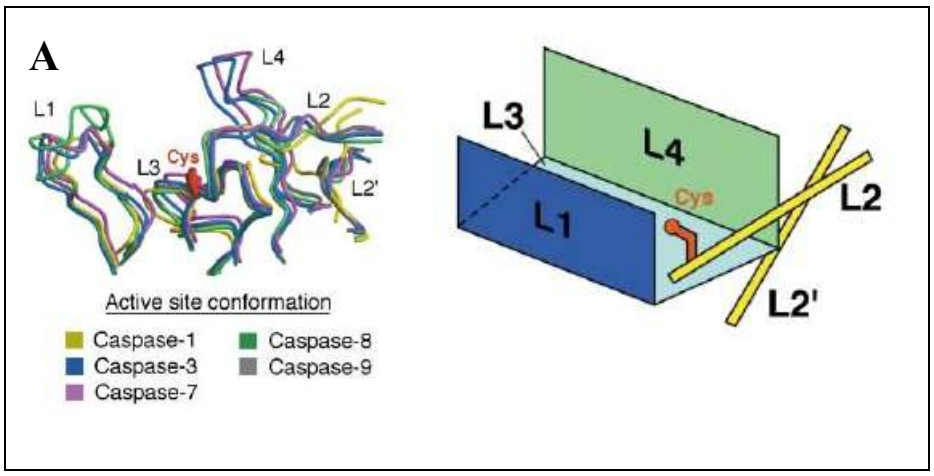


Figure 16 : Conformation du site actif des caspases (figure tirée de Shi, 2002). (A) Le site actif des caspases est conservé et se présente sous forme de sillon, façonné par quatre boucles nommées L1, L2, L3 et L4, capable d'accueillir un substrat. Parmi les quatres boucles, L1 et L3 sont relativement constantes tandis que L2 et L4 présentent une plus grande variabilité. (B) Schéma du sillon de liaison du substrat. L1 et L4 constituent deux côtés parallèles du sillon tandis que L3 sert de base au sillon. L2 présentant le résidu catalytique Cys est à la fin du sillon, en équilibre pour la catalyse. L2' permet de stabiliser les conformations de L1 et L4.

6. 1. 4. Les substrats des caspases.

Lorsqu'elles sont activées, les caspases vont s'attacher à éteindre les voies protectrices et à activer des molécules qui vont participer à la destruction cellulaire. Elles sont ainsi responsables de la protéolyse d'un large spectre de cibles cellulaires et vont générer un arrêt du cycle cellulaire, une mise hors service des mécanismes de réparation, un désassemblage des structures moléculaires, et une préparation des cellules apoptotiques à la phagocytose. On a identifié à ce jour plus de 280 substrats potentiels (pour revue, Fischer *et al.,* 2003). Le tableau 6 indique quelques substrats clivés par les caspases au cours de l'apoptose. Les substrats cellulaires connus incluent des protéines structurales (comme l'actine, la spectine/fodrine et des lamines nucléaires), des protéines nucléaires, des protéines impliquées dans le métabolisme et la réparation de l'ADN (comme la poly(ADP-ribose) polymérase ou PARP et la Topoisomérase I), des protéines kinases (au moins 13 protéines kinases sont clivées durant l'apoptose), ainsi que diverses formes inactives de caspases. De plus, des protéines impliquées dans la transduction du signal et dans l'expression de gènes, dans la régulation du cycle cellulaire, la prolifération, les maladies génétiques ou des protéines de régulation de l'apoptose sont aussi substrats des caspases. L'activation en cascade des caspases permet sans doute l'amplification et une meilleure régulation du signal initial. Le clivage du substrat, induit par la caspase, inactive principalement la protéine cible, mais il peut aussi

l'activer en clivant un domaine régulateur négatif ou en inactivant une sous-unité régulatrice de ce substrat (Hengartner, 2000). On peut citer l'exemple du clivage protéolytique par la caspase 3 du complexe formé par la DNase CAD/DFF40 (CAD : caspase-activated deoxyribonuclease ; DFF40 : DNA fragmentation factor of 40 kDa) et son inhibiteur ICAD/DFF45. La caspase 3 clive la sous-unité ICAD/DFF45 permettant la libération et l'activation de l'enzyme CAD/DFF40. Cette dernière sera responsable du clivage de l'ADN entre les nucléosomes, générant des fragments de 180 à 200 pb (Enari *et al.,* 1998 ; Liu *et al.,* 1997). La fragmentation de l'ADN, responsable du profil en échelle de l'ADN en électrophorèse ou « ladders », est une des caractéristiques majeures observées au cours de l'apoptose. Le clivage par la caspase 3 de la gelsoline provoque la formation des corps apoptotiques et le clivage de p21-activated kinase-2 et de la fodrine permet la dissociation de la membrane plasmique et du cytosquelette (Zimmermann *et al.,* 2001).

Il est toutefois à noter que certains substrats ne sont pas clivés dans tous les types cellulaires. L'actine, par exemple, est clivée dans la lignée myélomonocytaire U937 (Mashima *et al.,* 1997), dans les neurones (Villa *et al.,* 1998) et dans les thymocytes (Villa *et al.,* 1998) mais pas dans les autres types cellulaires durant l'exécution du programme apoptotique (Song *et al.,* 1997 ; Rice *et al.,* 1998). De plus, certains substrats sont clivés à des sites différents selon le type cellulaire. Ainsi, la topoisomérase I a un profil de clivage différent selon qu'il s'agisse de cellules de cancer de poumon (A549) ou de cellules de cancer du sein (MDA-MB-468) (Samejima *et al.,* 1999). Cette hétérogénéité pourrait soit refléter l'activation de caspases différentes, soit des variations dans l'accessibilité des substrats par les protéases, soit une combinaison de ces deux hypothèses.

Les caspases sont des enzymes extrêmement sélectives. Elles reconnaissent au moins quatre acides aminés contigus nommés P4-P3-P2-P1 et clivent leur substrat protéique au niveau du résidu de la partie carboxy-terminale de leur substrat (P1 ou position 1), habituellement un résidu aspartique (Asp). Bien que jusqu'alors les études montraient que le résidu P1 est exclusivement Asp (Sleath *et al.,* 1990 ; Howard *et al.,* 1991), des études plus récentes ont montré que des caspases clivent des substrats après un résidu Glu (Hawkins *et al.,* 2000 ; Srinivasula *et al.,* 2001b). De façon intéressante, la position P3 est invariablement un résidu Glu pour toutes les caspases mammifères examinées (Nicholson et Thornberry, 1997). La spécificité préferentielle pour le site de clivage des caspases peut donc être décrite ainsi : X-Glu-X-Asp. La spécificité des

caspases pour leur substrat est déterminée par la nature du résidu en P2 ou P4 du site de clivage dans le substrat.

	Protéines	Fonction	Caspase impliquée	Site de clivage	Références
cytosquelette	Spectine/Fodrine	Protéine de liaison à l'actine	3	DETD/S DSLD/S	Vanags *et al.,* 1996
	Gelsoline	Protéine de fragmentation de l'actine	3	DQTD/G	Kothakota *et al.,* 1997
	Gas-2	Protéine organisant l'actine	3 et 7	SRVD/G	Brancolini *et al.,* 1995
	PAK2	Protéine kinase impliquée dans la régulation du cytosquelette	6	SHVD/G	Rudel *et al.,* 1997
	Cytokératine 18	Protéine formant les filaments intermédiaires	3, 6 et 7	DALD/S	Ku *et al.,* 1997 ; Caulin *et al.,* 1997
	Lamine A	Protéine formant les filaments intermédiaires	3 et 7	VEID/NG	Takahashi *et al.,* 1996
noyau	PARP	Protéine kinase impliquée dans la réparation de l'ADN	3	DEVD/G	Tewari *et al.,* 1995
	DNA-PK	Protéine kinase impliquée dans la réparation de l'ADN	3	DEVD/N	Han *et al.,* 1996
	U1-snRNP	Facteur d'épissage	3	DGPD/G	Casciola-Rosen *et al.,* 1996
	ICAD	Protéine inhibant l'endonucléase CAD	3	DEPD/S DAVD/T	Enari *et al.,* 1998
	DFF45	Protéine inhibant l'endonucléase DFF40	3	DETD/S DAVD/T	Liu *et al.,* 1998
	Topoisomérase I	Enzyme modifiant la topologie de l'ADN	3	DDVD/Y	Casiano *et al.,* 1996 ; Samejima *et al.,* 1999
kinases	FAK	Protéine d'adhésion cellulaire et de contact intercellulaire	3, 6 et 7	VSWD/S DQTD/S	Wen *et al.,* 1997
	PKCδ	Protéine kinase C impliquée dans la signalisation cellulaire	3	DMQD/D	Emoto *et al.,* 1995
	PKCτ	Protéine kinase C	3	DEVD/K	Datta *et al.,* 1997
	MEKK-1	Protéine kinase impliquée dans la voie JNK	3	DTVD/G	Cardone *et al.,* 1997 ; Deak *et al.,* 1998

Tableau 6 : Quelques substrats clivés par les caspases exécutrices (tableau réalisé à partir des revues de Saraste et Pulkki, 2000 ; Nicholson, 1999 ; Cohen, 1997).

6. 1. 5. Régulation des caspases.

Etant donné les effets dévastateurs que pourraient avoir une activation inopportune ou une déficience d'activation des caspases, il n'est pas surprenant que cette étape soit finement régulée. En fait, non seulement l'activation mais aussi l'activité et la production des caspases sont régulées à plusieurs niveaux. On peut distinguer 4 niveaux de régulation : (i) régulation transcriptionnelle ; (ii) régulation post-transcriptionnelle ; (iii) régulation par des protéines naturelles; (iv) régulation post-traductionnelle.

a. Régulation transcriptionnelle.

Bien que l'apoptose puisse se produire dans la majorité des types cellulaires en absence de synthèse d'ARNm et de synthèse protéique *de novo* (Kaufmann *et al.,* 1993; Weil *et al.,* 1996), plusieurs observations suggèrent que la régulation de l'expression des gènes de pro-caspases puisse avoir une importance dans certaines conditions. Voici quelques exemples :

- la méthylation du promoteur du gène de la caspase 8 est en partie responsable du développement de neuroblastomes chez l'enfant et de leur résistance à l'apoptose induite par les cytokines comme TRAIL (Grotzer *et al.,* 2000 ; Zuzak *et al.,* 2002). L'utilisation d'aza-deoxy-cytidine, un inhibiteur de méthyltransférases, permet *in vitro* de rétablir l'expression de la caspase 8 dans ce type de neuroblastome et la restauration partielle de la sensibilité à TRAIL et d'autres composés (Fulda *et al.,* 2001) ;

- certains agents cytotoxiques stimulent la transcription de pro-caspases avant que la cellule ne déclenche son programme de mort (Droin *et al.,* 1998 ; Micheau *et al.,* 1999). Par exemple, lorsque des cellules leucémiques humaines sont incubées en présence d'étoposide (inhibiteur de la Topoisomérase II), le niveau d'expression de plusieurs messagers de pro-caspases croît significativement (Droin *et al.,* 1998). De même, une augmentation de l'ARNm de la caspase 3 a été montrée dans plusieurs modèles d'apoptose neuronale chez le rat (Chen *et al.,* 1998 ; Harrison

et al., 2000 ; Yakovlev *et al.,* 1997), ainsi que dans la lignée neuronale PC12 en condition de privation de facteurs de croissance (Liu *et al.,* 2002) ;

- les facteurs de transcrition p53 et E2F-1, impliqués dans de nombreuses voies apoptotiques et dans le développement de certains cancers (Evan et Vousden, 2001), contrôlent de nombreux gènes de la machinerie apoptotique dont notamment les gènes des caspases 2, 3, 7 8 et 9 pour E2F-1 (Nahle *et al.,* 2002) et des caspases 1, 8 et 6 pour p53 (Gupta *et al.,* 2001 ; Liedtke *et al.,* 2003 ; MacLachlan et El-Deiry, 2002) ;

- l'IFNγ (interféron gamma) est un des facteurs ayant une grande influence sur l'expression des gènes de plusieurs caspases. Un traitement des cellules U937 à l'IFNγ augmente très sensiblement l'expression de caspases ainsi que la sensibilité de ces cellules à l'apoptose (Tamura *et al.,* 1996). D'autres équipes révèlent que l'expression basale de certaines pro-caspases (1, 2 et 3) pourrait dépendre du facteur de transcription STAT1 (Kumar *et al.,* 1997) qui est impliqué dans la voie de signalisation induite par les interférons (Darnell *et al.,* 1994) et l'apoptose induite par le TNF. Plus récemment, deux équipes ont montré une induction STAT1-dépendante de l'expression de la caspase-8 par traitement à l'IFNγ (Fulda et Debatin, 2002 ; Yang *et al.,* 2003).

b. Régulation post-transcriptionnelle.

Certains gènes de caspases sont soumis à l'épissage alternatif, un mécanisme post-transcriptionnel qui permet de générer un grand nombre de protéines différentes à partir d'un seul ARNm. En général, la génération de formes courtes ou tronquées régule négativement l'apoptose. Voici quelques exemples :

- il existe deux formes de caspase 2 obtenues par épissage alternatif. Ainsi, Casp2L (Long) induit l'apoptose alors que Casp2S (Small) inhibe l'apoptose (Wang L *et al.,* 1994) ;

- la procaspase-3S est une protéine tronquée ne possédant pas de site catalytique. La surexpression de cette isoforme diminue l'apoptose induite par un inhibiteur du protéasome (Huang *et al.,* 2001b) ;

- la procaspase-9S est une forme tronquée ne possédant pas de site catalytique mais dont le domaine CARD est intact. Cette isoforme prévient l'activation de l'isoforme longue en

interférant de manière compétitive avec le recrutement par Apaf-1 au niveau de l'apoptosome (Seol et Billiar, 1999 ; Srinivasula *et al.,* 1999).

c. Régulation par des protéines naturelles.

La régulation des caspases au cours de l'apoptose peut être contrôlée par une multitude de protéines naturelles comme les protéines de la famille Bcl-2, Smac/DIABLO et Omi/HtrA2, les protéines de stress Hsp ainsi une grande variété de protéines inhibitrices virales comme CrmA, p35, FLIP, et les protéines IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein).

Il est maintenant bien établi que les protéines de la **famille Bcl-2** joue un rôle majeur dans la régulation de l'apoptose. Elles interviennent indirectement mais de manière centrale sur la régulation de l'activité des caspases (pour revue, Burlacu, 2003). Cette régulation passe par la modulation de l'activité de certaines caspases, principalement la caspase 9. Ainsi, en empêchant la libération du cytochrome c par la mitochondrie, Bcl-2 et Bcl-xL par exemple inhibent la formation du complexe Apaf-1/cytochrome c/caspase 9 qui est nécessaire à l'apoptose. Ces différents points seront détaillés au § **I - 7**.

De nombreuses études ont mis en évidence une corrélation entre les effets protecteurs des **protéines de stress ou Hsp** (heat shock protein) et la suppression de l'apoptose. Les protéines de stress Hsp27, Hsp90 et Hsp70 régulent négativement l'étape post-mitochondriale de l'apoptose : Hsp27 lie le cytochrome c lorsqu'il est libéré de la mitochondrie, tandis que Hsp90 et Hsp70 interagissent avec Apaf-1 pour prévenir la formation de l'apoptosome (Bruey *et al.,* 2000 ; Pandey *et al.,* 2000). Une autre étude rapporte que Hsp70 est capable d'inhiber l'activation de la caspase 3 (Mosser *et al.,* 1997). Une étude décrit la capacité de Hsp27 à inhiber l'activation de la pro-caspase 9 par le cytochrome c (Garrido *et al.,* 1999), tandis qu'une autre étude rapporte que Hsp27 est capable d'inhiber l'apoptose par la fixation directe de la pro-caspase 3 (Pandey *et al.,* 2000). La cible de Hsp27 diverge selon les auteurs, mais quelle qu'elle soit, il semble bien établi que cette chaperonne puisse intervenir dans la cascade apoptotique soit en aval soit directement au niveau de l'apoptosome. Ceci permet d'expliquer le rôle protecteur de Hsp27 sur l'apoptose induite par différents agents pro-apoptotiques (Huot *et al.,* 1991 ; Oesterreich *et al.,* 1993 ; Garrido *et al.,* 1997). Toutefois, il faut noter que le rôle protecteur des Hsp ne semble pas être systématique. En effet, il a été montré que dans certaines conditions, Hsp70 et Hsp90 pouvaient

induire l'apoptose (Liossis *et al.,* 1997 ; Galea-Lauri *et al.,* 1996). D'autres études rapportent que la protéine mitochondriale Hsp60 et sa co-chaperonne Hsp10 peuvent lier la pro-caspase 3 et favoriser son activation de manière ATP dépendante (Samali *et al.,* 1999 ; Xanthoudakis *et al.,* 1999).

Les virus ont développé diverses stratégies très efficaces afin d'inhiber la mort cellulaire prématurée de leur cellule hôte et la libération de cytokines pro-inflammatoires par les cellules infectées dans le but d'achever leur cycle de réplication et ainsi d'infecter de nouvelles cellules. À ce jour, de nombreuses molécules virales, et même végétales (Thatte *et al.,* 2000), ont été décrites comme ayant une activité inhibitrice de l'apoptose.

La **protéine CrmA** (Cytokine response modifier A), issue d'un gène précoce du virus de la vaccine (virus à ADN cowpox), est un inhibiteur de sérines-protéase de la famille des serpines et a pour fonction biologique de limiter la réponse inflammatoire de la cellule hôte et de favoriser le recrutement des macrophages aux sites d'infection (Palumbo *et al.,* 1989). CrmA est capable d'inhiber l'action du granzyme B mais aussi l'activité protéolytique des caspases 1 et 8 et, dans une moindre mesure, de la caspase 6. D'autres caspases, comme la 3 ou la 7, ne sont que peu affectées par cette molécule (Komiyama *et al.,* 1994 ; Nicholson *et al.,* 1995 ; Zhou Q *et al.,* 1997 ; Zhou et Salvesen, 1997 ; Ekert *et al.,* 1999). La **protéine p35**, produite par le baculovirus (virus à ADN), est capable d'inhiber une grande variété de caspases (1, 3, 6, 7, 8 et 10) mais n'a pas d'effet sur le granzyme B (Bump *et al.,* 1995 ; Zhou Q *et al.,* 1998). Ces deux protéines virales (CrmA et p35) sont des inhibiteurs compétitifs. Une fois clivées par une caspase, elles vont se lier à ces enzymes et ainsi empêcher la dégradation de nouveaux substrats (Komiyama *et al.,* 1994 ; Bump *et al.,* 1995).

Les baculovirus synthétisent d'autres inhibiteurs de caspases appelés **IAP** (Inhibitor of Apoptosis Protein) (Birnbaum *et al.,* 1994 ; Crook *et al.,* 1993) dont au moins huit analogues ont été identifiées chez l'homme (Liston *et al.,* 2003) (tableau 7). L'effet protecteur des IAP est dû à leur capacité à inhiber l'activité de certaines caspases (tableau 7 et figure 18). Deux mécanismes moléculaires principaux participent à l'inhibition des caspases par les IAP : (i) inhibition des caspases par les IAP *via* leur(s) domaine(s) BIR (Baculovirus IAP Repeats) (pour revue, Salvesen et Duckett, 2002) ; (ii) ubiquitinylation des caspases favorisant leur élimination par le protéasome.

Les IAP sont caractérisées par la présence de 1 à 3 domaines BIR (Baculovirus IAP Repeats), essentiels pour leur propriété anti-apoptotique (Duckett *et al.,* 1998), dans leur partie N-terminale et, à l'exception de Survivin, NAIP et Apollon, d'un domaine d'interaction protéine-protéine contenant un atome de zinc (RING finger) dans leur partie C-terminale. Enfin, cIAP-1 et cIAP-2 présentent un domaine CARD (Caspase Recruitment Domain) (figure 17).

IAP	Autres noms	Références	Caspase(s) inhibée(s)	Références
NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein)	BIRC1	Roy *et al.,* 1995 ; Liston *et al.,* 1996	3 et 7	Maier *et al.,* 2002
XIAP (X chromosome-linked IAP)	BIRC4, API3, MIHA, ILP-1, hILP	Liston *et al.,* 1996 ; Duckett *et al.,* 1996 ; Uren *et al.,* 1996	3, 7 et 9	Deveraux *et al.,* 1997; Roy *et al.,* 1997; Deveraux *et al.,* 1998 ; Suzuki *et al.,* 2001a
cIAP-1 (cellular IAP 1)	BIRC2, API1, MIHB, hIAP2	Rothe *et al.,* 1995 ; Liston *et al.,* 1996 ; Uren *et al.,* 1996	3, 7 et 9	Deveraux *et al.,* 1997; Roy *et al.,* 1997; Deveraux *et al.,* 1998
cIAP-2 (cellular IAP 2)	BIRC3, API2, MIHC, hIAP1	Rothe *et al.,* 1995 ; Liston *et al.,* 1996 ; Uren *et al.,* 1996	3, 7 et 9	Deveraux *et al.,* 1997; Roy *et al.,* 1997; Deveraux *et al.,* 1998 ; Huang *et al.,* 2000
Survivin	BIRC5, API4, TIAP (souris)	Ambrosini *et al.,* 1997 ; Liston *et al.,* 1996	3 et 7	Shin *et al.,* 2001
Livin	BIRC7, KIAP, ML-IAP	Lin *et al.,* 2000; Vucic *et al.,* 2000; Kasof et Gomes, 2001	3, 7 et 9	Lin *et al.,* 2000; Vucic *et al.,* 2000; Kasof et Gomes, 2001
Ts-IAP (testis-specific IAP)	BIRC8, ILP-2	Lagace *et al.,* 2001; Richter *et al.,* 2001	9	Richter *et al.,* 2001
Bruce	Apollon	Hauser *et al.,* 1998 ; Chen Z *et al.,* 1999	9	Qiu et Goldberg , 2005

Tableau 7 : Nomenclature et activités des IAP (tableau adapté de Liston *et al.,* 2003).

Différentes études ont montrées que seul BIR2 était requis pour inhiber les caspases 3 et 7 et que le domaine RING n'était pas nécessaire (Deveraux *et al.,* 1997 ; Takahashi *et al.,* 1998). De plus, il semble que cIAP-1 et cIAP-2 puissent se lier à TRAF-1 et 2 (TNF-R associated factors) grâce à leur motif BIR (Rothe *et al.,* 1995 ; Roy *et al.,* 1997). En outre, cIAP-1 peut aussi se complexer avec TRADD au niveau du domaine cytoplasmique de TNFR1 (Shu *et al.,* 1996). Ceci implique que les cIAP, ainsi que les vIAP (Vucic *et al.,* 1998), puissent exercer des effets inhibiteurs sur l'activation des caspases en aval des récepteurs de mort (figure 18) (Wang CY *et al.,* 1998). De toutes les IAP, la mieux caractérisée est XIAP (X chromosome-linked IAP). XIAP cible particulièrement les caspases 3 et 7 *via* son domaine BIR2 et la caspase 9 *via* son domaine BIR3 (Deveraux et Reed, 1999). De façon surprenante, des études structurales récentes révèlent que le

domaine BIR2 n'a presque pas de rôle dans le mécanisme d'inhibition des caspases 3 et 7 et que les contacts importants semblent résider dans la région précédent le BIR2 (Chai *et al.,* 2001 ; Huang *et al.,* 2001a ; Riedl *et al.,* 2001). Le mécanisme d'inhibition de la caspase 9 par le domaine BIR3 de XIAP nécessite le clivage de cette caspase (Srinivasula *et al.,* 2001a). Ce clivage est nécessaire pour l'inactivation par XIAP, qui inhibe la caspase 9 en réversant le processus d'activation dimérique (Shiozaki *et al.,* 2003).

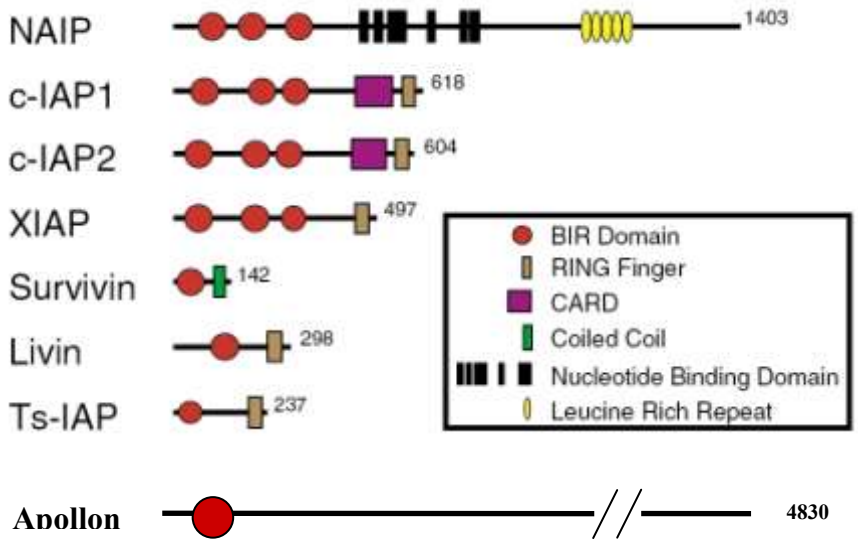


Figure 17 : Représentation des domaines structuraux des protéines IAP (figure tirée de Liston *et al.,* 2003).

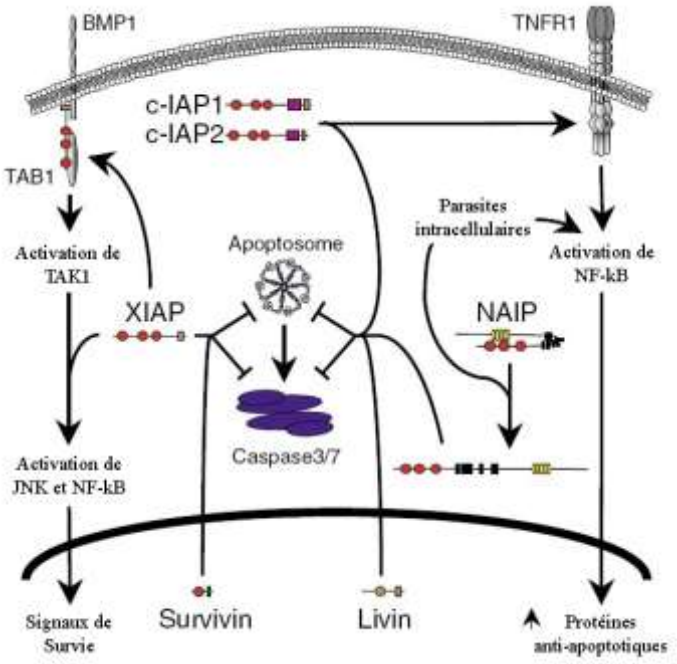


Figure 18 : Schéma résumant l'activité des IAP (figure tirée de Liston *et al.,* 2003). Les protéines IAP sont impliquées non seulement dans l'inhibition des caspases mais aussi dans différentes voies de transduction de signal. La Livine et la Survivine jouent un rôle dans la prévention de l'activation des caspases nucléaires. NAIP fixerait le LPS (lipopolysaccharide) secrété par les parasites intracellulaires *via* son domaine LRR (domaine riche en leucine), ce qui conduit à l'activation/exposition des domaines BIR.

En plus des mécanismes d'inhibition directe des caspases, les IAP possèdent des fonctions leur permettant d'inhiber des caspases en agissant comme les ubiquitine ligases E3, qui conduisent à une destruction rapide par la voie du protéasome. En effet, de nombreuses IAP, notamment cIAP-1, cIAP-2 et XIAP, contiennent un domaine doigt de zinc (RING finger) qui est un trait caractéristique des protéines ubiquitine ligase E3 (pour revue, Joazeiro et Weissman, 2000). Dans certaines cellules, les IAP catalysent leur propre ubiquitinylation et dégradation mais aussi d'autres protéines importantes de l'apoptose comme Smac/DIABLO, la caspase 3 active et TRAF-2 (Palaga et Osborne, 2002 ; Yang *et al.,* 2000 ; Hu et Yang, 2003 ; Suzuki *et al.,* 2001a ; Li *et al.,* 2002). Ainsi, il a été démontré que cIAP-2 et XIAP peuvent induire l'ubiquitinylation des caspases 3 et 7 (Huang *et al.,* 2000 ; Suzuki *et al.,* 2001a). En outre, quelques études montrent que XIAP, cIAP-1, cIAP-2 et Bruce sont capables d'ubiquitinyler la protéine Smac/DIABLO (MacFarlane *et al.,* 2002 ; Hu et Yang, 2003 ; Qiu et Goldberg, 2005), régulant ainsi indirectement l'activation des caspases.

Enfin, une étude récente a montré que XIAP jouerait un rôle dans la régulation de l'apoptose induite *via* les récepteurs de mort, en agissant en amont de la mitochondrie en inhibant la boucle

d'amplification dépendante de la caspase 3 (figure 18) (Wilkinson *et al.,* 2004). Ainsi, XIAP protégerait les cellules de l'apoptose et favoriserait la capacité de prolifération à long terme de cellules stimulées par Fas.

Les protéines **Smac/DIABLO** et **Omi/HtrA2** régulent aussi l'activité des caspases au cours de l'apoptose (Du *et al.,* 2000 ; Verhagen *et al.,* 2000 ; Hegde *et al.,* 2002). En effet, lorsqu'elles sont libérées de la mitochondrie, les protéines Smac/DIABLO et Omi/HtrA2 sont capables de se lier aux IAP, empêchant ainsi l'action protectrice des IAP et permettant alors l'activation des caspases (figure 19). Ce dernier point suggère aussi que l'apoptose peut être inhibée après relargage de cytochrome c de la mitochondrie.

Les protéines IAP sont surexprimées dans de nombreux cancers, suggérant leur implication dans la progression tumorale. Notamment, la Survivine a été détecté dans tous les types de cancers, avec des niveaux d'expression plus élevés dans les cancers du sein et du poumon (Tamm *et al.,* 1998). Ces protéines IAP. Cette famille de protéines possèdent deux caractéristiques principales qui en font des cibles thérapeutiques intéressantes (Nachmias *et al.,* 2004) : (i) les IAP sont les seuls facteurs qui agissent aussi bien au niveau des caspases initiatrices que des caspases effectrices (Deveraux *et al.,* 1999) ; (ii) l'effet biologique anti-apoptotique des IAP peut être converti en un effet pro-apoptotique (Clem *et al.,* 2001 ; Nachmias *et al.,* 2003). Ces protéines IAP constituent donc une cible intéressante pour de nouvelles stratégies de thérapie anti-cancéreuse.

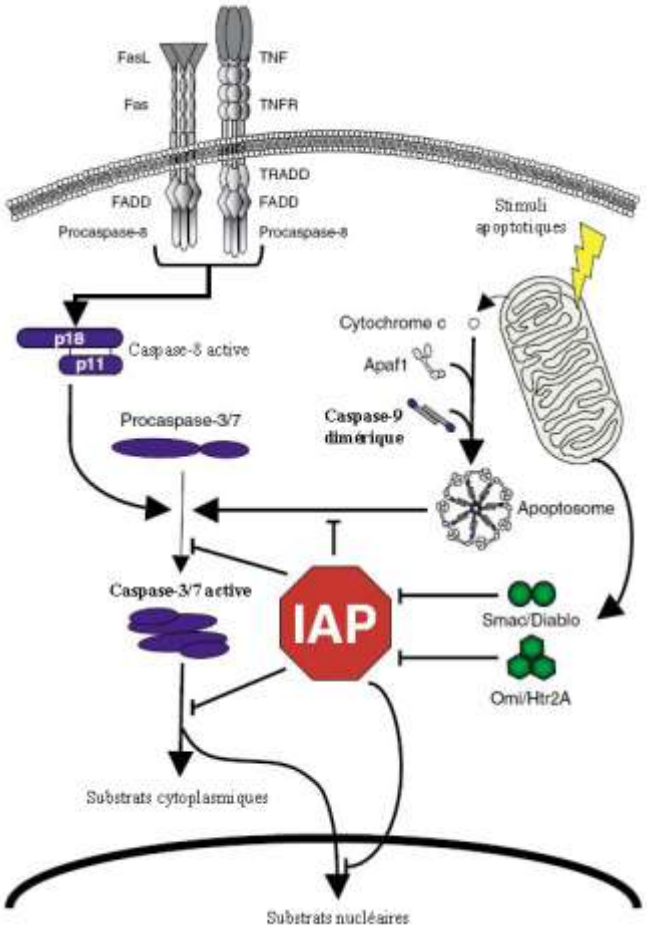


Figure 19 : Rôle régulateurs des protéines IAP et des protéines Smac/DIABLO et Omi/HtrA2 dans les voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose (figure tirée de Liston *et al.,* 2003). Les protéines IAP sont au carrefour des deux voies apoptiques : elles inhibent les caspases initiatrices (caspase 9) mais aussi les caspases effectrices (caspases 3 et 7). Les protéines Smac/DIABLO et Omi/HtrA2 inhibent les IAP et conduisent à la levée de l'inhibition sur les caspases.

Une autre famille de protéines virales, les **protéines FLIP** (FLICE Inhibitory Proteins), identifiée à l'origine chez le virus de l'herpès (virus à ADN) et le virus molluscipox (virus à ADN) (Bertin *et al.,* 1997; Thome *et al.,* 1997), sont capables d'inhiber les caspases. En effet, les protéines FLIP contiennent deux domaines DED qui vont leur permettre de se lier aux prodomaines des caspases 8 ou 10 et ainsi empêcher leur recrutement aux récepteurs de mort, notamment Fas et TNFRI (Bump *et al.,* 1995). Cette étape de recrutement peut donc être régulée par la protéine c-FLIP (cellular FLIP) (Irmler *et al.,* 1997b), qui est l'homologue humain de v-FLIP (viral FLIP), aussi appelée, selon les auteurs, I-FLICE (Hu *et al.,* 1997) /CASH (Goltsev *et al.,* 1997) /Flame-1 (Srinivasula *et al.,* 1997) /CLARP (Inohara *et al.,* 1997b) /MRIT (Han *et*

al., 1997)/Casper (Shu *et al.,* 1997) ou usurpin (Rasper *et al.,* 1998). Il existe une grande variété de transcrit de FLIP et donc plusieurs isoformes de FLIP. La forme courte ne présente que les deux domaines DED et ressemble structurellement à v-FLIP tandis que la forme la plus longue (FLIPL) possède, en plus des deux domaines DED, un domaine structural similaire à la caspase 8 mais avec un site enzymatique inactif. c-FLIP a été décrit comme pouvant protéger de l'apoptose (Hu *et al.,* 1997 ; Irmler *et al.,* 1997b ; Srinivasula *et al.,* 1997 ; Rasper *et al.,* 1998) ou induire l'apoptose (Han *et al.,* 1997 ; Inohara *et al.,* 1997b ; Shu *et al.,* 1997) selon la nature du transcrit et le type cellulaire considéré. Cependant, dans des conditions physiologiques, c-FLIP semble fonctionner comme un inhibiteur de la procaspase 8. Ainsi, il a été suggeré que la sensibilité des cellules T à l'apoptose induite par Fas était corrélée avec la diminution du taux d'ARNm de c-FLIP (Irmler *et al.,* 1997b ; Refaeli *et al.,* 1998). Le rôle régulateur de c-FLIP dans l'apoptose semble très complexe. Son effet pro- ou anti-apoptotique semble dépendre de la nature du transcrit, du type cellulaire considéré ainsi que du niveau d'expression de chacune des isoformes.

Les protéines E8 (issue du virus à ADN équin de l'herpès de type II), **MC159 et MC160** (issues du virus à ADN Poxvirus *Molluscum contagiosum*) utilisent une stratégie similaire afin d'inhiber l'apoptose. En effet, ces protéines possèdent, tout comme c-FLIP, deux domaines DED qui leur permettent d'inhiber le recrutement des pro-caspases 8 et 10 à leurs récepteurs (Duckett *et al.,* 1996 ; Uren *et al.,* 1996 ; Deveraux *et al.,* 1997).

Très récemment, une autre protéine virale, **la protéine 2BC**, issue du virus à ARN Picornavirus *Coxsackievirus B4* (CBV4), a été décrite comme inhibitrice de l'apoptose (Salako *et al.,* 2006). En effet, 2BC agirait en s'associant avec la caspase 3 et en inhibant ainsi sa fonction. En outre, c'est la première fois qu'une protéine issue d'un virus à ARN est décrite comme étant inhibitrice de l'apoptose.

d. Régulation post-traductionnelle.

De nombreuses études montrent que l'activité de certaines caspases peut être régulée par différentes modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation (Allan *et al.,* 2003), l'ubiquitinylation (Huang *et al.,* 2001b ; Suzuki *et al.,* 2001a) et la S-nitrosylation (Fiorucci *et al.,* 2000 ; Mannick *et al.,* 1999 et 2001). Voici quelques exemples :

- une étude indique que la kinase Akt peut phosphoryler la pro-caspase 9 humaine et ainsi inhiber son activation (Cardone *et al.,* 1998) mais que celle-ci est incapable de phosphoryler les caspases 3, 6 ou 7 ;

- la pro-caspase 3 peut être S-nitrosylée au niveau de la cystéine de son site catalytique, conduisant à l'inhibition de l'apoptose induite par le NO de cardiomyocytes (Maejima *et al.,* 2005) ;

- des études montrent que la cystéine du centre catalytique de certaines caspases peut être sujette à des phénomènes d'oxydation ou d'alkylation (Nicholson *et al.,* 1995 ; Nobel *et al.,* 1997 ; Fadeel *et al.,* 1998 ; Finkelstein *et al.,* 2005).

6. 1. 6. Invalidation génique.

Etant donné le grand nombre de caspases ainsi que l'absence d'inhibiteur réellement sélectif d'une caspase donnée, l'implication individuelle de ces protéases apoptogènes dans la mort cellulaire programmée n'a pu être étudiée jusqu'à présent qu'en générant des animaux déficients pour l'expression de certaines d'entre elles. A ce jour, seuls les gènes codant pour les caspases 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 11 et 12 ont été invalidés. Les effets de ces mutations par invalidation de gène ou « knock-out » en terme de développement et de défaut d'apoptose sont résumés dans le tableau 8.

gène knock-out	Anomalie(s) du développement	Défaut(s) d'apoptose	Références
caspase 1	Aucune	Défauts de la voie des récepteurs de mort	Kuida *et al.,* 1995 ; Li *et al.,* 1995
caspase 2	Développement quasi-normal avec excès d'ovocytes et déficit en motoneurones faciaux	Résistance des cellules germinales femelles à l'apoptose induite par la staurosporine ; résistance des lymphocytes B à l'action combinée de la perforine et du granzyme B (mais pas à Fas ou TNF, ni à l'étoposide, la staurosporine ou les rayonnements)	Bergeron *et al.,* 1998
caspase 3	Mortalité périnatale avec anomalies neuronales	Défauts d'apoptose au niveau du cerveau	Kuida *et al.,* 1996 ; Woo *et al.,* 1998 ; Zheng *et al.,* 1998
caspase 6	Aucune	Non déterminé	Zheng *et al.,* 1999
caspase 7	Mortalité embryonnaire	Non déterminé	Zheng *et al.,* 1999
caspase 8	Mortalité embryonnaire avec anomalies du muscle cardiaque et diminution des précurseurs hématopïétiques	Défauts de la voie des récepteurs de mort induite par Fas, TNF et DR3	Varfolomeev *et al.,* 1998 ; Salmena *et al.,* 2003
caspase 9	Mortalité périnatale avec anomalies neuronales	Défauts d'apoptose au niveau du cerveau/défauts de la voie mitochondriale en réponse aux UV et aux radiations γ	Kuida *et al.,* 1998 ; Hakem *et al.,* 1998
caspase 11	Aucune	Défauts d'apoptose des oligodendrocytes par le TNFα	Wang *et al.,* 1998
caspase 12	Aucune	Les fibroblastes sont résistants à la mort cellulaire induite par le stress réticulaire	Nakagawa *et al.,* 2000 ; Welihinda *et al.,* 1999

Tableau 8 : Mutations connues de gènes de caspase chez la souris et leurs effets en terme de développement et de défaut d'apoptose (tableau adapté de Los *et al.,* 1999 et Abraham et Shaham, 2004).

Toutes ces études menées sur les souris dont le gène de différentes caspases a été invalidé ont permis d'établir les notions suivantes : (i) aucune de ces invalidations géniques n'est capable d'inhiber totalement l'apoptose au cours du développement. En fait, les phénotypes les plus sévères sont obtenus avec les souris *caspase* $3^{-/-}$ et *caspase* $9^{-/-}$ qui possèdent des anomalies cérébrales majeures, cependant tous les autres tissus embryonnaires ne présentent que peu ou pas de différence avec les souris contrôles ; (ii) quelle que soit la caspase considérée, les effets sur l'apoptose sont à la fois dépendants du type cellulaire et du stimulus utilisé. Ainsi, le jeu de caspases impliquées est probablement différent selon l'effecteur et le tissu considérés.

6. 1. 7. « Apoptose » caspase indépendante.

Pendant de nombreuses années, les caspases ont été considérées comme des protéines indispensables au déroulement du processus apoptotique. Cependant, plusieurs groupes observent que l'inhibition des caspases dans certains modèles n'a aucun impact sur la survenue de l'apoptose (Assefa *et al.,* 2000 ; Carmody et Cotter, 2000 ; Lorenzo *et al.,* 1999 ; Mateo *et al.,* 1999 ; Mathiasen *et al.,* 1999), suggérant que d'autres facteurs enzymatiques seraient impliqués dans certaines formes d'apoptose. L'ablation de l'activité des caspases se révèle être insuffisante pour empêcher totalement ou prévenir la mort dans plusieurs cas (comme la privation en facteurs de croissance ou l'exposition à des glucocorticoïdes). De plus, il est aujourd'hui reconnu que plusieurs problèmes d'interprétation peuvent découler de l'utilisation des inhibiteurs de caspases souvent employés dans ce genre d'études (Lockshin et Zakeri, 2002). Ainsi, il est devenu évident que la mort cellulaire programmée peut survenir sans l'action des caspases. Par exemple, Bax et Bak peuvent tuer des cellules de mammifères en présence d'inhibiteurs de caspases à large spectre (Xiang *et al.,* 1996 ; McCarthy *et al.,* 1997). Il est aussi reconnu que Bax et Bak peuvent tuer des levures même si elles n'ont pas de caspases endogènes, notamment grâce à leur action sur la mitochondrie (Zha H *et al.,* 1996b ; Ink *et al.,* 1997), un effet prévenu par les protéines anti-apoptotiques.

En outre, plusieurs organismes ne possédant pas de caspases présentent des formes de mort cellulaire programmée. Toutefois, des protéines dont les séquences possèdent une certaine homologie avec les caspases ont été retrouvées chez ces organismes et ont été nommées paracaspases (présentes notamment chez *Caenorhabditis elegans, Dictyostelium discoideum* et quelques procaryotes) et métacaspases (chez les procaryotes, les levures, les protozoaires et les plantes) (Uren *et al.,* 2000 ; Koonin et Aravind, 2002 ; Lamkanfi *et al.,* 2002). La ressemblance de ces protéines avec les caspases se limite au motif catalytique caractéristique Cys-His de la sous-unité p20 ; elles n'ont pas de sous-unité p10. Une paracaspase a aussi été identifiée chez l'homme et son implication dans la mort cellulaire programmée a été démontrée (Uren *et al.,* 2000). Les fonctions de deux métacaspases (une de *Tripanosoma brucei* et une de *Saccharomyces cerevesiae*) ont été éclaircies chez la levure, chez laquelle elles se localisent au noyau (Szallies *et al.,* 2002). Celle de *T. brucei* entraîne la mort par dysfonction respiratoire (alors que quatre autres métacaspases du même organisme ne produisent pas de phénotype dans

ce système) ; en revanche, celle de *S. cerevisiae* ne produit pas de phénotype lorsqu'elle est surexprimée ou supprimée, mais prévient la mort causée par la surexpression d'une protéine avec laquelle elle interagit (Szallies *et al.,* 2002). Par contre, une autre étude propose, pour la seule métacaspase de *S. cerevisiae* (renommée YCA1, pour *yeast caspase 1*), un rôle dans la mort similaire à celui des caspases humaines (Madeo *et al.,* 2002). YCA1 est activée par clivage, comme les caspases. Le H_2O_2 induit la mort cellulaire programmée chez la levure qui est accompagnée d'une activité protéolytique similaire à celle des caspases. Cette réponse est complètement inhibée par la suppression de YCA1 ou fortement stimulée par sa surexpression. YCA1 est aussi reliée à la mort dans les cultures vieillissantes (Madeo *et al.,* 2002).

Plusieurs protéases autres que les caspases sont impliquées dans la mort cellulaire. Certaines études montrent notamment que la calpaïne, une protéase dépendante du calcium, et le système ubiquitine-protéasome sont essentiels à certaines formes d'apoptose dans les thymocytes (Squier *et al.,* 1994 ; Hirsch *et al.,* 1998). De plus, la sérine protéase Omi/Htr2A est relâchée de l'espace intermembranaire des mitochondries lors de l'apoptose et peut exercer son action apoptotique indépendamment des caspases (Hegde *et al.,* 2002 ; Wolf et Green, 2002). Cependant, le mécanisme par lequel Omi/HtrA2 induit une apoptose indépendante des caspases n'est pas encore élucidé. Récemment, un inhibiteur spécifique de l'activité d'Omi/HtrA2, qui réduit considérablement l'apoptose indépendante des caspases induite par la surexpression d'Omi/HtrA2, a été identifié (Cilenti *et al.,* 2003). Cet inhibiteur permettra probablement d'éclaircir le rôle d'Omi/HtrA2 dans l'apoptose indépendante des caspases. Par ailleurs, d'autres protéines favorisant la mort cellulaire programmée indépendamment des caspases sont aussi relâchées des mitochondries. Parmi celles-ci, la flavoprotéine AIF, qui est phylogénétiquement très conservée chez les procaryotes et les eucaryotes (Koonin et Aravind, 2002), peut favoriser la mort de plusieurs façons : en générant des ROS *via* son activité NADH oxydase ; en collaborant avec un facteur cytosolique (non identifié) pour perméabiliser la mitochondrie ; ou encore en coopérant avec un facteur nucléaire pour causer la condensation de la chromatine en marge du noyau et la digestion de l'ADN en gros fragments (~50 kpb) (Candé *et al.,* 2002). Aucun des effets cellulaires de l'AIF cités précédemment ne peut être perturbé par l'introduction de zVADfmk, indiquant que cette protéine agit indépendamment des caspases pour induire l'apoptose. Cependant, il faut noter que certaines études ont suggéré que la fonction de l'AIF se situe en aval et est strictement dépendante de l'activation des caspases (Arnoult *et al.,* 2002 et 2003). Enfin, une autre protéine, l'Endonucléase G, est aussi relâchée de l'espace

intermembranaire des mitochondries et cause la fragmentation internucléosomale de l'ADN indépendamment des caspases (contrairement à la CAD, Caspase Activated DNase) (Parrish *et al.,* 2001 ; van Loo *et al.,* 2001).

6. 1. 8. Quelques autres fonctions des caspases.

Outre leur implication essentielle dans l'induction de la mort cellulaire programmée, de plus en plus d'exemples tendent à prouver que l'activation des caspases ne conduit pas systématiquement à la mort cellulaire. Les caspases peuvent ainsi être impliquées dans des processus divers et indépendants de l'apoptose tels que le processus inflammatoire, la régulation du cycle cellulaire, la prolifération, la différenciation ou la migration cellulaire (pour revue : Oliver et Vallette, 2005 ; Schwerk et Schulze-Osthoff, 2003; Perfettini et Kroemer, 2003 ; Sadowski-Debbing *et al.,* 2002). Cependant, par soucis de concision, je ne détaillerai pas de tous ces points dans ce manuscrit et je ne citerai que quelques exemples, notamment sur l'implication des caspases dans les processus de différenciation qui représente le modèle non apoptotique le mieux documenté à ce jour (voir figure 20).

Le processus d'énucléation est souvent comparé à un processus d'apoptose incomplète. Par exemple, lors de la différenciation des cellules embryonnaires érythroïdes en cellules sanguines rouges matures (Morioka *et al.,* 1998), l'activation des caspases conduit à un ensemble de changements morphologiques caractéristiques de l'apoptose sans induire la mort cellulaire. En outre, l'utilisation d'inhibiteurs des caspases est capable de ralentir cette différenciation. Une approche ARN interférence a confirmé l'implication et la nécessité de la caspase 3 dans la maturation érythroïde (Carlile *et al.,* 2004). Un autre exemple est la différenciation terminales des fibres du cristallin (Ishizaki *et al.,* 1998) ; en effet, l'énucléation des cellules du cristallin nécessite la présence continue de FGF (Fibroblast Growth Factor) et des caspases et l'inhibiteur synthétique z-VAD-fmk est capable de prévenir l'énucléation et la différenciation terminale des fibres du cristallin. L'activation des caspases a été impliquéee dans d'autres processus de différenciation impliquant la perte du noyau comme la différenciation des plaquettes à partir des mégacaryocytes matures (De Botton *et al.,* 2002 ; Plenchette *et al.,* 2001) ou la différenciation terminale des kératinocytes (Eckhart *et al.,* 2000 ; Lippens *et al.,* 2000).

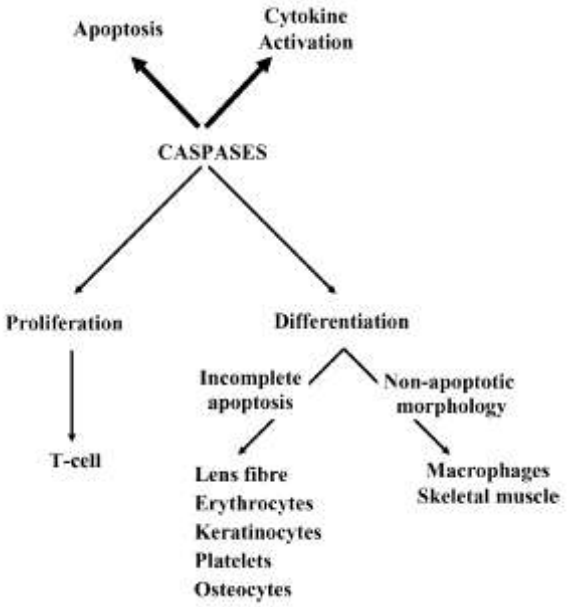


Figure 20 : Représentation schématique des fonctions non apototiques des caspases (figure tirée de Oliver et Vallette, 2005).

Il existe d'autres exemples de différenciation cellulaire impliquant les caspases sans entraîner d'énucléation ni l'apparition de changements morphologiques de l'apoptose, comme la différenciation des monocytes en macrophages (Sordet *et al.,* 2002), la différenciation des cellules du muscle squelettique (Barnoy et Kosower, 2003 ; Fernando *et al.,* 2002), des cellules ostéoblastiques (Mogi et Togari, 2003) et enfin des cellules du trophoblaste placentaire humain (Black *et al.,* 2004).

Afin d'assurer la dissociation des fonctions apoptotiques et non apoptotiques des caspases, des niveaux de régulation supplémentaires sont mis en jeu.

Le clivage spécifique des substrats est une hypothèse émergente : ainsi, la sélectivité des substrats par les caspases dans certaines conditions pourrait leur permettre d'éviter le déclenchement de l'apoptose et d'assurer leurs fonctions non apoptotiques. Par exemple, au cours de la différenciation érythrocytaire, les caspases peuvent agir comme régulateurs négatifs de la différenciation en déclenchant l'apoptose des érythrocytes immatures *via* le clivage du facteur de transcription GATA-1, acteur clé de ce processus de différenciation (De Maria *et al.,* 1999). Cependant, Zermati et coll. (2001) démontrent que les caspases actives sont également

nécessaires à la différenciation érythrocytaire, clivant dans ce cas les protéines PARP, lamine B et Acinus mais pas GATA-1.

En revanche, il reste à clarifier comment la cellule peut restreindre l'activité protéolytique des caspases envers les substrats sélectionnés. Une hypothèse est que la régulation du clivage des substrats peut être due à une modification du substrat lui-même, rendant son site de clivage inaccessible aux caspases. Par exemple, la phosphorylation du résidu sérine de la préséniline-2 adjacent au site de clivage par la caspase 3 la protège du clivage (Walter *et al.,* 1999). Le clivage spécifique peut également être contrôlé par une compartimentalisation spécifique des caspases, de leurs régulateurs et/ou l'accessibilité des substrats. Pour exemple, nous pouvons citer la localisation de la caspase 3 active au cours de la différenciation des mégacaryocytes en plaquettes. En effet, il a été observé que la caspase 3 active a une localisation cytoplasmique ponctuée dans les mégacaryocytes en maturation alors qu'elle est diffuse dans le cytoplasme des mégacaryocytes sénescents (De Botton *et al.,* 2002). Enfin, une autre solution possible pour la restriction de clivage est une activation limitée des caspases (Perfettini et Kroemer, 2003). Par exemple, au cours de la prolifération des lymphocytes T, il a été proposé que la formation du DISC engendre une activité accrue de la caspase 8 et conduit au déclenchement de l'apoptose ; cependant, lorsque la caspase 8 n'est pas associée au DISC, son activité serait beaucoup plus limitée et ne permettrait pas le déclenchement de l'apoptose mais serait suffisante à l'activation de la prolifération (Newton *et al.,* 1998).

7. Apaf-1 et l'Apoptosome.

La protéine Apaf-1, homologue humain de CED-4, a été isolée et caractérisée par l'équipe de Wang X. (Zou *et al.,* 1997). Quant à l'Apoptosome, complexe formé par les protéines Apaf-1, cytochrome c (Apaf-2) et caspase 9 (Apaf-3), il a été identifié par Li P. et coll. (1997) grâce à un système acellulaire d'étude de l'activation des caspases.

Une étude a montré que la protéine Apaf-1 est indispensable à l'activation de la pro-caspase 9 et que cette activation nécessite la présence de ses cofacteurs, le cytochrome c et le dATP (Li P. *et al.,* 1997). La liaison du cytochrome c sur Apaf-1 augmente l'affinité de ce dernier pour l'ATP et le dATP (Jiang *et al.,* 2000) et génère un changement conformationnel d'Apaf-1. Le complexe Apaf-1/cytochrome c/ATP/dATP peut alors recruter, *via* le domaine CARD d'Apaf-1, la pro-

caspase 9. Le complexe ainsi formé est appelé Apoptosome (Zou *et al.,* 1999) (figure 21). L'étude de la structure tridimensionnelle de l'Apoptosome par microscopie cryo-électronique révèle une structure en forme de médaillon avec sept bras (figure 22) (Acehan *et al.,* 2002). La maturation de la pro-caspase 9 s'effectue à l'intérieur de l'Apoptosome, au niveau de l'axe du médaillon (figure 22), par un processus d'autocatalyse. Après maturation, la caspase 9 reste liée à l'Apoptosome d'où elle clive les caspases exécutrices comme la caspase 3 et 7 (Rodriguez et Lazebnik, 1999).

Des études ont montré que le clivage de la pro-caspase 3 était dépendant de son recrutement à l'apoptosome (Zou *et al.,* 1999 ; Cain *et al.,* 1999) et que ce n'était donc pas un événement cytoplasmique du à la libération d'une caspase 9 active (Zou *et al.,* 1999). D'autres études ont montré qu'Apaf-1 est également capable d'interagir avec d'autres protéines telle que Bcl-xL et les caspases 4 et 8 (Hu Y *et al.,* 1998a ; Pan *et al.,* 1998b). L'interaction entre Apaf-1 et Bcl-xL se fait principalement par le domaine BH4 de Bcl-xL (Huang *et al.,* 1998), conduisant à la séquestration d'Apaf-1 et par conséquent à l'impossibilité d'activer la pro-caspase 9.

L'invalidation du gène d'Apaf-1 conduit à un phénotype semblable, bien que plus sévère, à celui obtenu lors de l'invalidation des gènes des caspases 3 et 9 (cf § **I – 6. 1. 6**). Brièvement, les souris *apaf-1*$^{-/-}$ présentent un développement anormal du cerveau, avec une apoptose réduite au niveau du cerveau, une hyperprolifération des neurones et plusieurs anomalies faciales, et meurent au stade embryonnaire E16 (Cecconi *et al.,* 1998; Yoshida *et al.,* 1998). La plupart des autres tissus, notamment le système immunitaire, sont normaux (Yoshida *et al.,* 1998). Toutefois on peut noter un décalage dans la disparition de la membrane interdigitale qui n'est éliminée que plus tardivement chez les souris *caspases 3*$^{-/-}$ et *caspase 9*$^{-/-}$. Ce résultat semble indiquer qu'Apaf-1 module l'activité d'autres caspases. Le fait que la majeure partie de la mort cellulaire soit normale au cours du développement, ajouté à l'observation que les fibroblastes embryonnaires de souris *apaf-1*$^{-/-}$ présentent une apoptose quasi-normale après un traitement à la staurosporine (Cecconi *et al.,* 1998) laissent suggérer l'existence d'autre(s) molécule(s) jouant un rôle équivalent à celui d'Apaf-1.

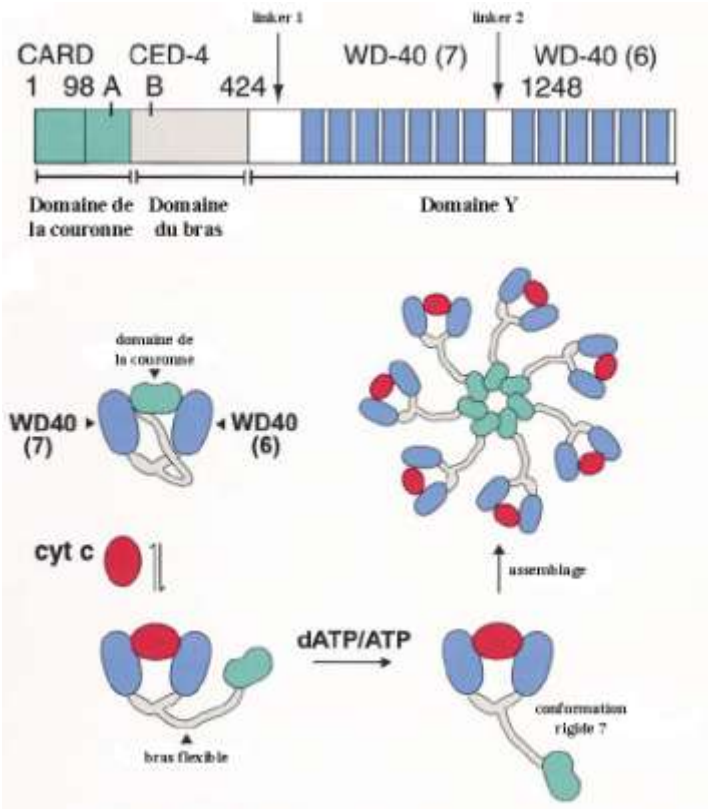


Figure 21 : Les différents domaines d'Apaf-1 et leur rôle dans l'assemblage de l'Apoptosome (figure tirée de Acehan *et al.,* 2002). Les positions relatives du domaine CARD, du domaine d'homologie à CED-4, des motifs WD-40 et des sites de liaison des nucléotides (A et B) sont indiquées. La fixation du cytochrome c puis du dATP/ATP conduisent à l'activation du monomère d'Apaf-1 et à l'assemblage de l'Apoptosome.

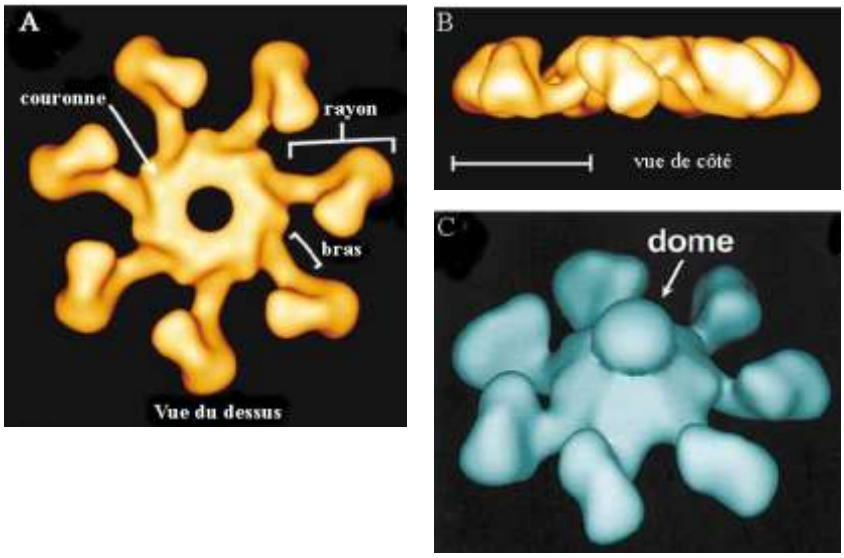


Figure 22 : Structure tridimensionnelle de l'Apoptosome (figure tiréede Acehan *et al.,* 2002). La structure en heptamère (en médaillon) de l'apoptosome révélée par microscopie cryo-électronique est montrée avant (en orange) et après (en bleu) la liaison de la pro-caspase 9. (A) vue par le dessus ; (B) vue par le côté, la barre d'échelle représente 100 Å ; (C) vue de dessus oblique montrant l'apoptosome avec la pro-caspase 9 liée au-dessus, formant un dôme.

8. Les protéines de la famille Bcl-2.

Les membres de la famille Bcl-2 (B cell lymphoma 2) jouent un rôle important dans la régulation des voies de signalisation de la mort cellulaire programmée. Cette modulation se situe en amont de l'activation des caspases. La translocation chromosomique t(14,18) dans les lymphomes folliculaires humains de type B a permis d'identifier le premier membre de cette famille, le proto-oncogène *bcl-2* (Tsujimoto *et al.,* 1984 ; Tsujimoto et Croce, 1986 ; Cleary *et al.,* 1986). Suite à la translocation, le gène est placé sous le contrôle de la chaîne lourde des immunoglobulines (chromosome 14) et est surexprimé dans les lymphocytes B (Tsujimoto *et al.,* 1984). Curieusement, contrairement à tous les oncogènes précédemment identifiés, qui agissent en augmentant la prolifération cellulaire, *bcl-2* n'augmente pas la vitesse de division des cellules mais promeut la survie cellulaire (Vaux *et al.,* 1988). En outre, Bcl-2 est capable de bloquer l'apoptose induite par de nombreux stimuli (dommages de l'ADN, irradiations, expression d'oncogènes, glucocorticoïdes,...) (Yang et Korsmeyer, 1996) : c'est un régulateur négatif de l'apoptose.

8. 1. Présentation des membres de la famille Bcl-2.

La famille Bcl-2 se compose d'une trentaine de membres qui peuvent être classés dans trois groupes, en fonction de leur rôle et de leur structure (Borner, 2003):

- les membres anti-apoptotiques qui présentent généralement 3 à 4 domaines d'homologie BH (Bcl-2 homology) (Kelekar et Thompson, 1998) nommés BH1, BH2, BH3 et BH4. Ce groupe comprend la protéine Bcl-2, mais aussi Bcl-xL (Boise et Thompson, 1997), Bcl-w (Gibson *et al.,* 1996), Mcl-1 (Kozopas *et al.,* 1993 ; Zhou P. *et al.,* 1997), A1 (Lin *et al.,* 1993)/Bfl1 (Choi *et al.,* 1995), NR-13/Nrh (Gillet *et al.,* 1995 ; Aouacheria *et al.,* 2001), Boo/Diva/Bcl-2-L10/Bcl-B (Song *et al.,* 1999 ; Inohara *et al.,* 1998b ; Zhang H *et al.,* 2001 ; Ke *et al.,* 2001), E1B 19K d'adénovirus (Han *et al.,* 1996a), BHRF1 du virus Epstein-Barr (Henderson *et al.,* 1993 ; Kawanishi, 1997), KSHV-Bcl-2 du virus du sarcome de Kaposi (Cheng *et al.,* 1997b ; Sarid *et*

al., 1997) et CED-9 de *Caenorhabditis elegans*. De façon intéressante, une protéine anti-apoptotique identifiée par le groupe de Reed (Zhang H *et al.,* 2000), BAR, présente une structure originale avec un domaine RING, un domaine SAM, un DED suivi d'un domaine trans-membranaire. Le domaine SAM est requis pour l'interaction de BAR avec Bcl-2 et Bcl-xL et pour l'inhibition de l'apoptose induite par Bax tandis que son domaine DED lui permet d'interagir avec les procaspases et ainsi d'abolir la mort cellulaire induite par Fas. En fait, BAR est capable de former un complexe comprenant la pro-caspase 8 et Bcl-2. Les auteurs suggèrent que BAR, tout comme FLIP, entrerait en compétition avec les protéines adaptatrices, telle que FADD, pour la liaison aux pro-caspases 8 et 10 (Tschopp *et al.,* 1998). Une autre protéine anti-apoptotique récemment découverte, Bcl-X_{ES}, présente les seuls domaines d'homologie BH2 et BH4 (Schmitt *et al.,* 2004) ;

- les membres pro-apoptotiques à multidomaines qui présentent 3 domaines d'homologie BH1, BH2 et BH3. Ce groupe comprend les protéines Bax (Oltvai *et al.,* 1993), Bak (Chittenden *et al.,* 1995b ; Farrow *et al.,* 1995 ; Kiefer *et al.,* 1995), Bcl-X_S (Boise et Thompson, 1997), Bok (Hsu SY *et al.,* 1997) /Mtd (Inohara *et al.,* 1998a) ;

- les membres pro-apoptotiques à BH3 seulement ou « BOP » (BH3 only proteins). Ce groupe comprend les protéines Bad (Yang *et al.,* 1995), Bid (Wang K *et al.,* 1996), Bik (Boyd *et al.,* 1995)/Nbk (Han *et al.,* 1996b), Bim (O'Connor *et al.,* 1998)/Bod (Hsu SY *et al.,* 1997 et 1998), Hrk/Harakiri/DP5 (Inohara *et al.,* 1997a), Blk (Hegde *et al.,* 1998), BNIP3/Nip3 (Chen G *et al.,* 1997; Yasuda *et al.,* 1998), BNIP3L/BNIP3α/Nix (Matsushima *et al.,* 1998; Yasuda *et al.,* 1999; Chen *et al.,* 1999 ; Imazu *et al.,* 1999), Noxa (Oda *et al.,* 2000), PUMA (Nakano et Vousden, 2001)/Bbc3 (Han *et al.,* 2001), Bmf (Puthalakath *et al.,* 2001) et EGL-1 (Conradt et Horvitz, 1998).

8. 2. Structure primaire des membres de la famille Bcl-2.

Les membres de la famille Bcl-2 présentent peu d'homologie de séquence de l'ensemble des acides aminés (figure 23). En revanche, on retrouve au sein de leur structure primaire un ou

plusieurs domaines conservés appelés BH (Bcl-2 homology) qui sont largement impliqués dans les interactions protéiques.

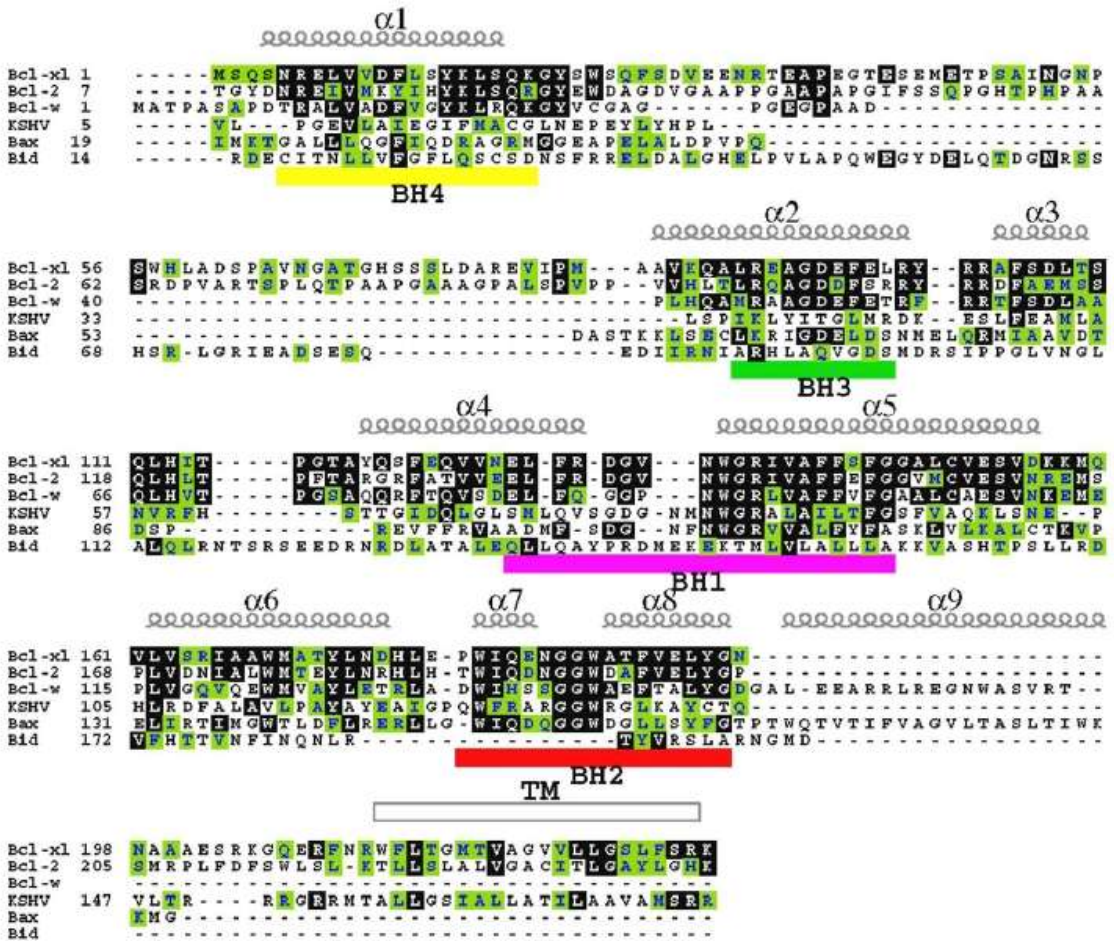


Figure 23 : Alignement des séquences des protéines de la famille Bcl-2 dont les structures sont résolues (figure tirée de Petros *et al.,* 2004). Les domaines d'homologie BH de Bcl-xL sont indiqués par des rectangles de couleur. Les hélices α 1 à 8 de Bcl-xL, ainsi que les hélices α 9 de Bax et Bcl-w et les domaines transmembranaires putatifs de Bcl-xL, Bcl-2 et Bcl-2 KSHV sont indiqués au-dessus des séquences. Les carrés noirs indiquent les résidus strictement conservés, alors que les carrés verts indiquent les résidus homologues.

8. 2. 1. Les domaines BH1 et BH2.

Des études de mutagenèse dirigée ont permis de démontrer que les domaines BH1 et BH2 des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL sont nécessaires pour leur fonction d'inhibition de l'apoptose et pour l'hétérodimérisation avec la protéine pro-apoptotique Bax (Borner *et al.,* 1994b ; Yin *et al.,* 1994). En revanche, des délétions ou des mutations dans les domaines BH1 et

BH2 de la protéine pro-apoptotique Bax n'empêchent ni l'inhibition de l'effet protecteur de Bcl-xL, ni la liaison de Bax à Bcl-xL ou à Bcl-2 (Simonian *et al.,* 1996a et 1996b ; Zha H *et al.,* 1996a). De même, la délétion des domaines BH1 et BH2 de Bak n'inactive pas cette protéine (Chittenden *et al.,* 1995a). Ces résultats suggèrent que l'importance des domaines BH1 et BH2 diffèrent selon que la protéine est anti- ou pro-apoptotique.

8. 2. 2. Le domaine BH3.

Le domaine BH3 est moins conservé que les domaines BH1 et BH2. Néanmoins, ce domaine est le seul domaine commun à quasiment tous les membres de la famille Bcl-2. De plus, il est le seul domaine conservé des protéines pro-apoptotiques à BH3 seulement.

Le domaine BH3 des protéines pro-apoptotiques comme Bax, Bak ou Bad est suffisant mais non nécessaire pour la liaison à Bcl-2 ou Bcl-xL et pour promouvoir l'apoptose (Chittenden *et al.,* 1995a ; Kim JK *et al.,* 2004). En fait, ce domaine semble jouer un rôle primordial puisque l'introduction du domaine BH3 de Bax dans Bcl-2 est suffisante pour convertir Bcl-2 en une protéine agoniste de mort (Hunter et Parslow, 1996). De plus, le fait que les protéines à BH3 seulement dépourvues de domaines BH1 et BH2 présentent une fonction pro-apoptotique efficace renforce l'idée que le domaine BH3 joue un rôle clé dans le déclenchement de l'apoptose. Des études de mutagenèse ont permis de montrer que l'activité pro-apoptotique du domaine BH3 s'exerce par l'hétérodimérisation avec les protéines soit anti- soit pro-apoptotiques. Par exemple, une étude montre que le domaine BH3 de Bid est nécessaire pour s'hétérodimériser avec le domaine BH1 de Bcl-2 ou de Bax (Wang K *et al.,* 1996). Dans cette même étude, il est montré qu'un mutant BH3 de Bid s'hétérodimérise toujours avec Bcl-2 mais perd sa fonction pro-apoptotique. Inversement, un mutant BH3 de Bid qui conserve ses propriétés pro-apoptotiques interagit avec Bax mais pas avec Bcl-2. Les auteurs suggèrent ainsi un modèle où le domaine BH3 de la protéine Bid représente le domaine de mort et que Bid est un ligand de Bax. En revanche, le domaine BH3 de Bad requiert une liaison à Bcl-2 pour conduire au déclenchement de l'apoptose, suggérant que Bad exerce sa fonction pro-apoptotique par hétérodimérisation avec une protéine anti-apoptotique (Zha J *et al.,* 1997).

8. 2. 3. Le domaine BH4.

Le domaine BH4, située en N-terminale des protéines, est le domaine le moins conservé de tous les domaines BH. Il est présent dans la plupart des protéines anti-apoptotiques et est retrouvé de façon exceptionnelle pour la protéine pro-apoptotique Bcl-x_S. Ce domaine apparaît être essentiel à la fonction anti-apoptotique de la protéine. En effet, des mutations dans ce domaine font perdre la fonction « pro-survie » des protéines anti-apoptotiques mais convertissent également celles-ci en membres pro-apoptotiques (Cheng *et al.,* 1997a). En outre, une délétion du domaine BH4 inactive la protéine anti-apoptotique Bcl-2, qui reste néanmoins capable de s'associer avec la protéine Bcl-2 entière (Hanada *et al.,* 1995 ; Hunter et Parslow, 1996). Par ailleurs, des formes tronquées de Bcl-2 qui ne contiennent plus ce domaine BH4 sont produites par le biais du clivage des caspases durant l'apoptose et accélèrent le processus apoptotique (Grandgirard *et al.,* 1998).

8. 2. 4. Le domaine C-terminal.

La plupart des membres de la famille Bcl-2 possèdent en C-terminal un domaine transmembranaire (TM) putatif qui leur permet d'être localisés dans la membrane mitochondriale externe, le réticulum endoplasmique ou la membrane nucléaire externe (Nguyen *et al.,* 1993; Akao *et al.,* 1994; Hsu YT *et al.,* 1997).

Ce domaine ne semble pas essentiel à la fonction anti-apoptotique de Bcl-2 puisque sa substitution par d'autres séquences hydrophobes n'a pas d'effet (Borner *et al.,* 1994b ; Tanaka *et al.,* 1993). De plus, la délétion du seul domaine hydrophobe peut réduire l'activité de Bcl-2 dans certains cas (Hunter et Parslow, 1996) ou être sans effet dans d'autres cas (Borner *et al.,* 1994b ; Muchmore *et al.,* 1996). Ces données suggèrent que d'autres domaines de la protéine sont impliqués dans sa localisation fonctionnelle.

8. 3. Structure tridimensionnelle des membres de la famille Bcl-2.

A l'heure actuelle, les structures tridimensionnelles d'au moins sept membres de la famille Bcl-2 ont été résolues. La première étude de structure des membres de cette famille s'est portée sur Bcl-xL (Muchmore *et al.,* 1996). Ensuite, chronologiquement, les structures de Bid (Chou *et al.,* 1999 ; McDonnell *et al.,* 1999), Bax (Suzuki *et al.,* 2000), Bcl-2 (Petros *et al.,* 2001), Bcl-2v (Huang Q *et al.,* 2002), Bcl-w (Denisov *et al.,* 2003 ; Hinds *et al.,* 2003) et Mcl-1 (Day *et al.,* 2005) ont été résolues. Par ailleurs, les structures de complexes formés entre certains membres de cette famille ont également été résolues : Bcl-xL/Bad (Kelekar *et al.,* 1997 ; Ottilie *et al.,* 1997) ; Bcl-xL/BakBH3 (Sattler *et al.,* 1997) ; Mcl-1/BadBH3 (Petros *et al.,* 2000) ; Bcl-xL/Bim (Liu X *et al.,* 2003). Ces études ont permis d'apporter des informations essentielles à la compréhension des fonctions et propriétés des membres de la famille Bcl-2

Ainsi, il s'est avéré que certains membres de la famille semblent avoir la capacité de former des pores. En effet, la structure tridimensionnelle de Bcl-xL s'est révélée être similaire à celles de certaines toxines bactériennes (figure 24) capables de former des pores ou des canaux transmembranaires (Muchmore *et al.,* 1996). L'étude structurale de Bcl-xL a été réalisée à partir d'une forme active de la protéine délétée de sa partie carboxy-terminale. La structure de Bcl-xL (figure 25) consiste en 8 hélices α connectées par des boucles de longueurs différentes. Les deux hélices centrales hydrophobes, α5 et α6, confèrent à Bcl-xL une similarité de structure avec la toxine diphtérique et les colicines A et E1. Comme pour ces toxines, les domaines de Bcl-xL sont assez longs pour traverser une bicouche membranaire. La seule hélice α6 de Bcl-xL ne peut s'insérer dans les membranes, suggérant que la présence des deux hélices α5 et α6 soit requise pour l'insertion membranaire. Cette synergie pourrait s'expliquer par la présence de résidus entre les hélices α5 et α6 qui apporterait des charges complémentaires et une stabilité conséquente à la structure (Garcia-Saez *et al.,* 2004). Ainsi, il a été postulé que les membres de la famille Bcl-2 sont capables de former des pores dans les membranes. En fait, il a été montré que les molécules anti-apoptotiques Bcl-xL (Minn *et al.,* 1997) et Bcl-2 (Antonsson *et al.,* 1997 ; Schendel *et al.,* 1997 ; Schlesinger *et al.,* 1997) et la protéine pro-apoptotique Bax (Antonsson *et al.,* 1997 ; Schlesinger *et al.,* 1997), pouvaient former des canaux ioniques en s'insérant dans des membranes lipidiques. Le canal ionique généré par Bcl-2 présente une conductance optimale à pH acide ainsi qu'une préférence pour des cations monovalents (comme K^+ et Na^+) (Antonsson *et al.,* 1997 ;

Schendel *et al.,* 1997; Schlesinger *et al.,* 1997). Le canal formé par Bcl-xL est sélectif des cations à pH physiologique mais perd cette sélectivité à pH acide (Minn *et al.,* 1997). En revanche, Bax forme un canal plutôt spécifique des anions et peu sensible au pH (Antonsson *et al.,* 1997; Schlesinger *et al.,* 1997). Nous verrons ultérieurement l'implication des membres de la famille Bcl-2 dans la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe.

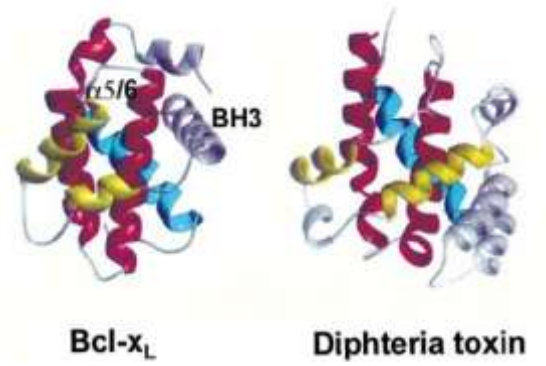


Figure 24 : Homologie structurale de Bcl-xL et de la toxine diphtérique (figure tirée de Borner, *Molecular Immunology,* 2003)

Afin de déterminer les bases de l'hétérodimérisation entre les membres de la famille Bcl-2, les structures tridimensionnelles du complexe Bcl-xL/Bad (Kelekar *et al.,* 1997 ; Ottilie *et al.,* 1997 ; Petros *et al.,* 2000) et du complexe formé par Bcl-xL et un peptide BH3 de Bak (Sattler *et al.,* 1997) ont été résolues. La structure RMN du complexe formé par Bcl-xL et du peptide BH3 de Bak a été réalisée avec une protéine Bcl-xL délétée de la boucle flexible entre les hélices α1 et α2 et du domaine transmembranaire putatif. Le peptide BH3 de Bak se lie au niveau du sillon hydrophobe de Bcl-xL formé par les domaines BH1, BH2 et BH3 de la protéine (Sattler *et al.,* 1997). Dans Bcl-xL, les deux hélices centrales α5 et α6 sont entourées d'un côté des hélices α3 et α4 et de l'autre côté des hélices α1 et α2. Une séquence NWGR, hautement conservée parmi les membres de la famille Bcl-2, précède l'hélice α5 et joue un rôle structural et fonctionnel important. En effet, le résidu tryptophane réalise des liaisons hydrophobes avec les résidus des hélices α7 et α8 alors que le résidu arginine joue un rôle clé dans la liaison aux protéines pro-apoptotiques comme Bax ou Bak.

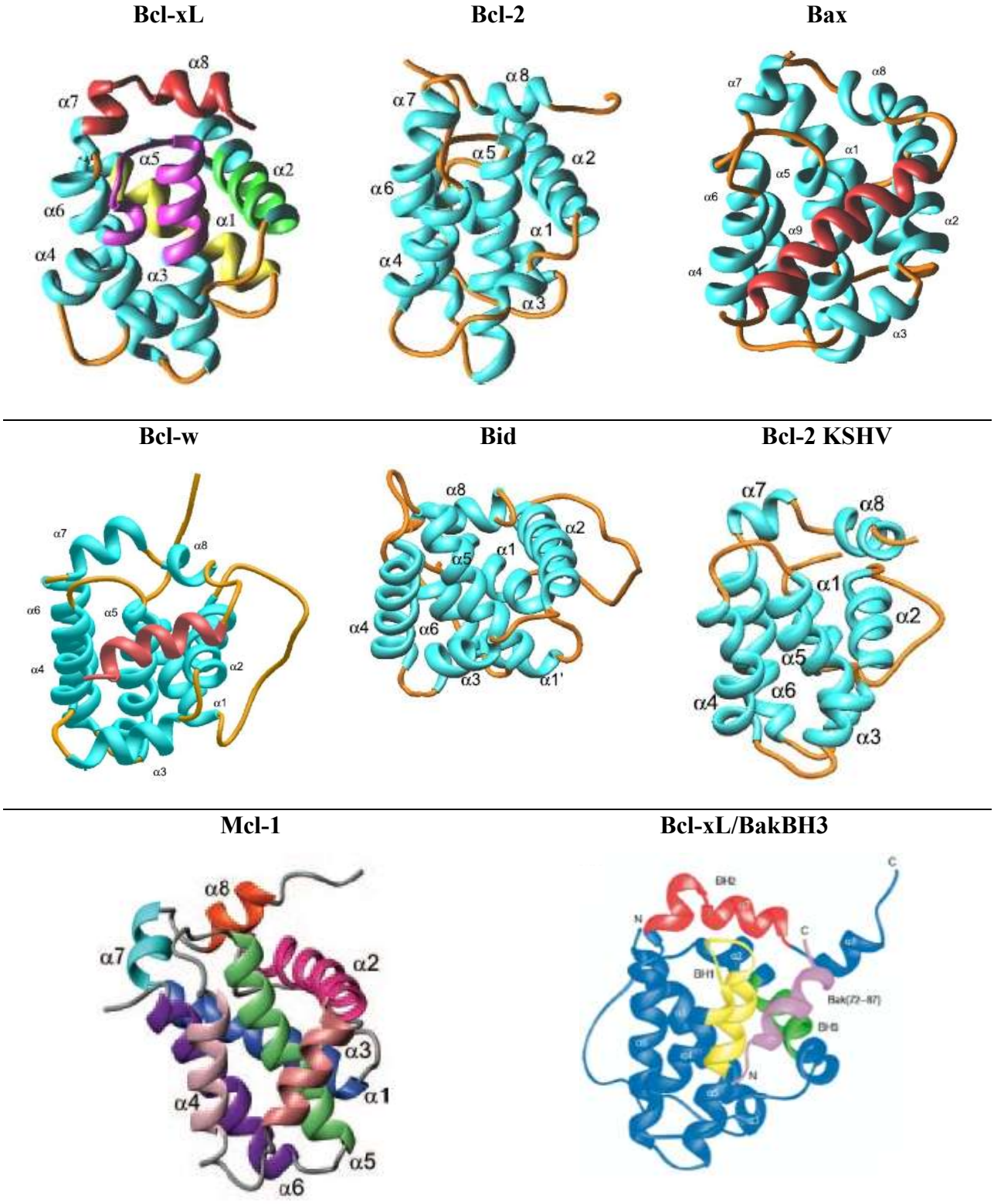


Figure 25 : Représentation des structures tridimensionnelles de quelques membres de la famille Bcl-2 (figure tirée de Sattler *et al.,* 1997 ; Petros *et al.,* 2004 ; Day *et al.,* 2005). Pour Bcl-xL, le domaine BH1 est coloré en magenta, BH2 en rouge, BH3 en vert et BH4 en jaune. La boucle non structurée entre les hélices α1 et α2 est omise pour plus de clarté. Les hélices α9 de Bcl-w et Bcl-2 KSHV, domaines transmembranaires putatifs, sont en rouges. Pour le complexe Bcl-xL/BakBH3, les domaines BH1, BH2 et BH3 de Bcl-xL sont représentés en jaune, rouge et vert respectivement ; le peptide BakBH3 est en magenta.

La structure RMN de Bcl-2 a été déterminée avec une protéine chimérique Bcl-2/Bcl-xL où une boucle non structurée putative de Bcl-2 a été remplacée par une boucle courte de Bcl-xL (Petros *et al.,* 2001). La structure de Bcl-2 (figure 25) est similaire à celle de Bcl-xL : elle est composée de huit hélices α avec un sillon hydrophobe. La plus grande différence entre Bcl-2 et Bcl-xL réside dans l'hélice α3 qui forme une partie du sillon hydrophobe. D'autres différences résident dans la structure primaire des deux protéines, ce qui conduit à un changement des caractéristiques du sillon hydrophobe, expliquant la différence d'affinité de peptides BH3 de protéines pro-apoptotiques comme Bax et Bak. En effet, les deux peptides lient Bcl-xL avec une affinité 10 fois plus forte que Bcl-2, suggérant que les deux protéines ont des spécificités différentes pour les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2. Une autre étude récente montre que l'homodimérisation de la protéine Bcl-2 implique deux surfaces de liaison distinctes, une surface « accepteur » et une surface « donneur », arrangeant ainsi la topographie de la protéine de telle sorte qu'elle puisse capturer de façon efficace la protéine Bax activée (Zhang Z *et al.,* 2004).

La conformation générale de la protéine pro-apoptotique Bax (figures 25, 29 et 31) ressemble à celle des protéines Bcl-2 et Bcl-xL (Suzuki *et al.,* 2000). L'étude structurale de Bax a été réalisée sur la protéine entière avec le domaine transmembranaire putatif en C-terminal. Bax possède sept hélices α amphipathiques groupées autour de deux hélices centrales hydrophobes, les hélices α5 et α6. Cependant, par rapport aux protéines Bcl-2 et Bcl-xL, ces deux hélices α5 et α6 sont plus accessibles et la protéine Bax présente une plus grande concentration de zones hydrophobes en son sein. Ainsi, Bax apparaît comme le meilleur candidat pour une insertion membranaire.

La structure tridimensionnelle de l'homologue viral de Bcl-2, KSHV (Kaposi sarcoma-associated herpes virus) a aussi été résolue (Huang Q *et al.,* 2002). En dépit d'une faible homologie de séquence entre la protéine virale et Bcl-2 ou Bcl-xL, la conformation générale de ces protéines est similaire (figure 25).

Bien que Bid soit considérée comme une protéine pro-apoptotique à BH3 seulement par homologie de séquence à Bcl-2, sa structure tridimensionnelle (figure 25) révèle que cette protéine présente tous les éléments structuraux de Bcl-2 et Bcl-xL (Chou *et al.,* 1999 ; McDonnell *et al.,* 1999). En effet, comme les protéines anti-apoptotiques, Bid présente deux helices α centrales hydrophobes entourées de six hélices α amphipathiques. La plus grande différence se situe à l'extêmité N-terminale où une hélice α1' est antiparallèle à l'hélice α1. Par ailleurs, un domaine hydrophobe situé en surface de la protéine est horizontal et ne forme pas de

poche profonde comme observée chez Bcl-2 ou Bcl-xL, suggérant que Bid ne forme pas d'homo- ou d'hétérodimères avec d'autres membres de la famille Bcl-2. De plus, contrairement à Bak, certains résidus hydrophobes du domaine BH3 de Bid sont partiellement enfouis et un changement de conformation s'avère nécessaire pour que le domaine BH3 de Bid puisse se lier à Bcl-xL de la même façon que le peptide BH3 de Bak (Chou *et al.,* 1999). Le clivage de Bid par les caspases se ferait au niveau de la longue boucle précédent le domaine BH3 de Bid (Li H *et al.,* 1998) et ne changerait pas la structure globale de la protéine (Chou *et al.,* 1999). Le domaine BH3 serait alors exposé et des changements de charge et d'hydrophobicité auraient lieu en surface, résultant dans un changement de la localisation cellulaire de Bid (McDonnell *et al.,* 1999).

La structure tridimensionnelle de Mcl-1 (Myeloid Cell Leukemia-1) a été réalisée avec une protéine tronquée de ses régions N- et C-terminale, en ne conservant que la partie homologue à Bcl-2, et révèle que cette protéine présente une structure similaire aux autres protéines de survie (figure 25) : c'est une structure hélicoïdale composée d'un cœur hydrophobe et d'un sillon hydrophobe exposé en surface (Day *et al.,* 2005). Seuls quelques résidus dans le sillon hydrophobe diffère Mcl-1 de ses homologues, et contrairement aux autres protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, Mcl-1 possède un sillon dans une conformation intermédiaire entre celui de Bcl-xL complexé à un peptide BH3 et non complexé. De plus, des expériences de mutagenèse montrent que les mutations affectent que faiblement la capacité de fixation de Mcl-1. Cependant, une mutation ponctuelle de Bad anihile sa capacité à se lier à Mcl-1 mais n'affecte pas sa capacité à se lier à Bcl-2, Bcl-xL ou Bcl-w.

Les données relatives aux structures tridimensionnelles des membres de la famille Bcl-2 sont des outils indispensables dans la compréhension des modes de fonctionnement de ces protéines. En outre, l'élucidation du mode d'action et de la sélectivité des protéines à BH3 seulement s'avère utile pour le design de drogues mimétiques des BH3.

8. 4. Localisation subcellulaire des membres de la famille Bcl-2.

Tandis que la protéine anti-apoptotique Bcl-2 est largement retrouvée associée aux membranes après fractionnement subcellulaire, les protéines Bcl-w et Bcl-xL sont présentes principalement

dans les fractions cytosoliques (Hsu YT *et al.,* 1997 ; O'Reilly *et al.,* 2001). De plus, des études d'imagerie ont permis de localiser Bcl-2 au niveau de l'enveloppe nucléaire, du réticulum endoplasmique et de la MME (Monaghan *et al.,* 1992 ; Krajewski *et al.,* 1993 ; Lithgow *et al.,* 1994), tandis que les fractions de Bcl-xL et Bcl-w liées aux membranes présentent une spécificité pour la mitochondrie (O'Reilly *et al.,* 2001 ; Kaufmann *et al.,* 2003 ; Wilson-Annan *et al.,* 2003). Le domaine transmembranaire de Bcl-2 contient moins de résidus basiques que celui d'autres protéines anti-apoptotiques et les études de mutagenèse suggèrent que cela induit une plus large distribution membranaire de Bcl-2 (Kaufmann *et al.,* 2003).

Les protéines pro-apoptotiques Bid, Bad ou Bim sont trouvées dans le cytosol (Reed, 1997 ; Gross *et al.,* 1999 ; Desagher et Martinou, 2000), tandis que la protéine Bak est associée aux membranes de la mitochondriale et du réticulum endoplasmique (Nutt *et al.,* 2002). La protéine pro-apoptotique Bax est présente de façon prédominante dans le cytosol (Hsu YT *et al.,* 1997 ; Wolter *et al.,* 1997) dans un état inactif. Suite à un stimulus apoptotique, la protéine Bax subit un changement conformationnel, lui permettant de transloquer à la mitochondrie où elle s'insère dans la MME (Hsu YT *et al.,* 1997 ; Gross *et al.,* 1999). Sa fixation à cet organelle est étroitement associée avec les processus d'insertion/oligomérisation et le relargage consécutif dans le cytosol de nombreuses protéines mitochondriales apoptogènes comme le cytochrome *c*, Smac/Diablo et AIF (Martinou et Green, 2001). D'autres évènements additionnels sont nécessaires à la libération de cytochrome *c* (Annis *et al.,* 2005 ; Makin *et al.,* 2001). Ainsi, il a été suggéré que l'interaction avec le pore majeur de la MME est impliquée dans le processus de perméabilisation (Shimizu *et al.,* 2000). Le signal d'adressage mitochondrial de Bcl-2 et Bcl-xL a été attribuée de manière non équivoque à leur extrêmité C-terminale (Kaufmann *et al.,* 2003 ; Nguyen *et al.,* 1993). Par homologie aux autres membres de la famille Bcl-2 qui s'ancrent à la MME par leur extrémité C-terminale, il a été postulé que Bax cible la mitochondrie par son domaine C-terminal. Les études structurales de Bax et Bcl-w montrent que l'hélice α9 C-terminale hydrophobe bouche le sillon hydrophobe formé par les domaines BH1, BH2 et BH3, suggérant que ces protéines ne peuvent interagir avec les membranes intracellulaires (Suzuki *et al.,* 2000 ; Hinds *et al.,* 2003 ; Denisov *et al.,* 2003). L'inaccessibilité de cette hélice α9 semble importante pour augmenter la solubilité des protéines et contribuerait au fait que ces protéines se localisent de façon prédominante dans le cytosol avant l'induction de l'apoptose. Cependant, la situation pour Bax semble plus complexe. Malgré l'homologie de son extrêmité C-terminale avec celle de Bcl-2, le domaine C-terminal de Bax ne présente pas les caractéristiques de signal d'adressage mitochondrial conventionnel. En effet, il a été montré que l'extrêmité C-terminale de

Bax ne pouvait permettre l'adressage d'une protéine rapporteur à la mitochondrie (Cartron *et al.,* 2003b ; Nechushtan *et al.,* 1999 ; Tremblais *et al.,* 1999). Il a été récemment montré dans notre laboratoire que Bax présente un signal d'adressage à la mitochondrie au niveau de sa partie N-terminale contenant l'hélice α1. Des mutations dans cette hélice, ou la sur-expression d'une protéine chimérique hélice α1 fusionnée à la protéine cytosolique RFP (Red Fluorescent Protein), inhibent l'apoptose Bax dépendante (Cartron *et al.,* 2003b). Ainsi, contrairement aux autres protéines de la famille Bcl-2, Bax cible la mitochondrie par son domaine N-terminal. Ces derniers résultats suggèrent l'existence de sites d'association de Bax à la mitochondrie et que l'interaction se ferait par l'hélice α1 de Bax. Aussi, à la vue de l'importance de l'association de Bax avec la mitochondrie au cours de l'apoptose, notre équipe s'est attachée à identifier le (ou les) récepteur(s) de Bax au niveau de la mitochondrie au moyen de différentes stratégies comme le double-hybride bactérien, le pontage moléculaire ou la méthode de peptide-scan. Notre équipe a ainsi identifié la protéine TOM22 (translocase of the outer mitochondrial membrane of 22 kDa), récepteur des protéines mitochondriales codées par le génome nucléaire, comme récepteur mitochondrial de Bax et interagissant avec l'hélice α1 de Bax (Bellot *et al.,* soumis). De plus, la saturation de TOM22 par des anticorps spécifiques ou la diminution de l'expression de TOM22 inhibe l'apoptose Bax dépendante, suggérant que cette interaction est une étape limitante dans l'accomplissement du programme de mort cellulaire. Ces données fournissent de nouvelles perspectives dans le mécanisme d'association de Bax avec la mitochondrie et définissent un nouveau niveau de régulation de l'apoptose qui reste à être exploré.

8. 5. Interaction fonctionnelle des protéines de la famille Bcl-2.

Les études de mutagenèse dirigée combinées aux études structurales des membres de la famille Bcl-2 ont permis d'établir des modèles d'interactions fonctionnelles entre les membres de cette famille (pour revue, Cory *et al.,* 2003).

Un premier modèle proposé par Cheng et coll. suggère que Bcl-2 serait un récepteur passif pour des ligands, les protéines pro-apoptotiques à BH3 seulement, et que lorsque tous les récepteurs seraient occuppés, Bax et Bak induiraient l'apoptose (Cheng *et al.,* 2001). Dans ce modèle, les protéines à BH3 seulement déclencheraient ensuite l'activation de Bax et Bak. Or, excepté pour

les protéines Bid et Bim, aucune donnée dans la littérature ne montre que les protéines à BH3 seulement puissent lier Bax ou Bak.

Un modèle dérivé en conséquence du premier postule que les protéines à BH3 seulement interagiraient pour la plupart avec les seules protéines anti-apoptotiques de type Bcl-2. Ainsi les protéines à BH3 seulement empêcheraient les protéines anti-apoptotiques de séquestrer tBid, qui pourrait alors se lier par son domaine BH3 à Bax et Bak et les activerait (Letai *et al.,* 2002). Bid clivé par le granzyme B et Bid clivé par la caspase 8 diffèrent en taille et induisent le relargage de cytochrome *c* en interagissant préférentiellement avec Bax et Bak respectivement (Cartron *et al.,* 2003a). Or l'absence de la protéine Bid a un impact physiologique très minime (Yin *et al.,* 1999), contrairement aux effets provoqués par la perte de Bax et Bak (Lindsten *et al.,* 2000) (voir § **I – 8. 7**). Ceci suggère qu'il existerait d'autres molécules de type Bid avec des fonctions redondantes. Ce modèle met en avant l'importance du rôle joué par les protéines à BH3 seulement dans l'activation de la voie mitochondriale suite aux stimuli apoptotiques. Les protéines à BH3 seulement constituent de véritables régulateurs : en effet, elles intègrent les différents signaux apoptotiques et conduisent le signal apoptotique vers les différents membres à multi-domaines de la famille Bcl-2 (Yin *et al.,* 1999 ; Bouillet *et al.,* 1999 et 2002). En outre, la localisation intracellulaire des protéines à BH3 seulement semble jouer un rôle critique dans le contrôle de la mort cellulaire, permettant aux cellules de réagir rapidement et efficacement aux multiples signaux apoptotiques. Je discuterai de ce point plus en détail dans le § **I – 8. 6**.

A l'heure actuelle, les données de la littérature auraient tendance à proposer un mécanisme d'activation de l'apoptose par inhibition des protéines anti-apoptotiques *via* la formation d'hétérodimères mitochondriaux de type Bcl-2/protéine à BH3 seulement, conduisant à la libération et à l'activation de la protéine Bax (Borner, 2003 ; Bouillet *et al.,* 2002). Les études structurales des complexes Bcl-xL/BadBH3 ou Bcl-xL/BakBH3 illustrent ces possibles interactions *in vitro* et de nombreuses études semblent confirmer l'interaction Bim/Bcl-xL (Puthalakath *et al.,* 1999 ; Strasser *et al.,* 2000). Néanmoins, certaines protéines à BH3 seulement, comme Bid, sont capables d'activer directement la protéine Bax (Eskes *et al.,* 2000). Ainsi, un nouveau modèle présenté par Letai et coll. propose une subdivision des protéines à BH3 seulement en deux sous-groupes : celui des protéines de type Bid (Bid, Bim) capables d'activer directement Bax et Bak et celui des protéines de type Bad (Bad, Bik) qui sensibilisent la cellule à l'apoptose par occupation du site responsable de l'hétérodimérisation Bcl-2/Bax (Letai *et al.,* 2002).

Enfin, les protéines de la famille Bcl-2 sont capables de réguler leurs propres fonctions en interagissant entre-elles par dimérisation. Ce point est discuté par la suite dans le § **I – 8. 6. 1**.

8. 6. Régulation de l'activité des membres de la famille Bcl-2.

Les membres pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 sont régulées par de nombreux mécanismes post-traductionnels comme la dimérisation, les phosphorylations-déphosphorylations, le clivage/la protéolyse, la localisation sub-cellulaire/la séquestration dans le cytoplasme (Gross *et al.,* 1999), mais aussi par des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels.

8. 6. 1. Par dimérisation.

Une caractéristique importante des membres de la famille Bcl-2 est de pouvoir former des homo- ou des hétérodimères. Les homodimères anti-apoptotiques Bcl-2 ou Bcl-xL se font par l'intermédiaire des domaines BH1 et BH2 et Bcl-2 semble exercer son action inhibitrice de l'apoptose par hétérodimérisation avec Bax (Yin *et al.,* 1994). Les membres pro-apoptotiques contenant un domaine BH3, comme Bax ou Bak, peuvent interagir avec Bcl-2 ou Bcl-xL par l'intermédiaire à la fois de leur domaine BH3 mais aussi grâce à la poche hydrophobe formée par les domaines BH1, BH2 et BH3 de Bcl-2 et Bcl-xL (Chittenden *et al.,* 1995a et 1995b; Zha H. *et al.,* 1996a ; Sattler *et al.,* 1997 ; Simonen *et al.,* 1997). En fait, il semble que la balance entre la vie et la mort cellulaire soit influencée par le type et la proportion de dimères anti- ou pro-apoptotiques formés (Oltvai *et al.,* 1993 ; Oltvai et Korsmeyer, 1994 ; Sedlak *et al.,* 1995). L'effet protecteur de Bcl-2 se manifesterait lorsque celle-ci serait en excès par rapport à Bax, le piégeant et empêchant son action par hétérodimérisation. Ainsi par exemple, lorsque Bax est préférentiellement exprimé, des homodimères Bax/Bax se formeront et conduiront à la mort cellulaire. En revanche, si c'est Bcl-2 qui est majoritairement exprimée alors il y aura formation de dimères Bcl-2/Bcl-2 et donc survie cellulaire. Cependant une autre étude semble indiquer que, pour des raisons structurales, des homodimères Bcl-2 ne peuvent pas se former et que Bcl-2 jouerait son rôle anti-apoptotique sous forme monomérique (Conus *et al.,* 2000). Les membres ne

comportant qu'un domaine BH3, comme Bad ou Bid, ne peuvent pas former d'homodimères et ne possédent pas d'activité intrinsèque. En fait, ils jouent leur rôle pro-apoptotique soit en formant des dimères avec des membres anti-apoptotiques (par exemple Bad/Bcl-xL ou Bak/Bcl-xL) réduisant ainsi la capacité de ceux-ci à former des homodimères protecteurs (Kelekar *et al.,* 1997 ; Sattler *et al.,* 1997), soit en favorisant la constitution de dimères pro-apoptotiques (par exemple Bid/Bax) activant ou augmentant ainsi la capacité de ceux-ci à potentialiser l'apoptose (Letai *et al.,* 2002 ; Kuwana *et al.,* 2005).

En définitive, les membres de la famille Bcl-2 sont capables de moduler la fonction des molécules régulatrices de l'apoptose par l'intermédiaire d'interactions protéine-protéine.

8. 6. 2. Par phosphorylation.

La conformation des protéines de la famille Bcl-2 et leur action sur le devenir cellulaire peuvent être modulées par des modifications post-traductionnelles, notamment par phosphorylation.

L'exemple le mieux connu est la phosphorylation de Bad dans des lignées cellulaires dépendantes des facteurs de croissance (figure 26). En présence du facteur de croissance IL-3, la protéine Bad est phosphorylée au niveau de deux résidus sérine par la kinase Akt, permettant son association avec la protéine 14-3-3 qui la séquestre alors dans le cytosol (Zha J *et al.,* 1996). En absence d'IL-3, Bad est déphosphorylée et peut donc se dissocier de la protéine 14-3-3. Une fois le domaine BH3 de Bad libéré, elle peut interagir avec Bcl-xL et ainsi bloquer son action protectrice (Kelekar *et al.,* 1997 ; Zha J *et al.,* 1997).

La protéine anti-apoptotique Bcl-2 est également soumise à une régulation par phosphorylation. Elle est phosphorylée au niveau de résidus spécifiques situés dans une boucle flexible en réponse à divers stimuli comme le traitement par le taxol qui est un agent de chimiothérapie (Haldar *et al.,* 1995 ; Scatena *et al.,* 1998), l'addition de facteurs de survie (Poommipanit *et al.,* 1999) et l'activation de la protéine kinase C (Ruvolo *et al.,* 1998). Dans la plupart des cas, la phosphorylation rend Bcl-2 incapable d'interférer avec l'apoptose (Haldar *et al.,* 1995 ; Chang *et al.,* 1997). Néanmoins, dans d'autres systèmes cellulaires, la phosphorylation de Bcl-2 augmente son activité (Deng *et al.,* 1998 ; Breitschopf *et al.,* 2000).

La protéine Bax est également régulée par phosphorylation. Ce point est discuté dans le § **II - 3**.

8. 6. 3. Par clivage.

Le clivage protéolytique est un autre mode de régulation décrit pour au moins quatre membres de la famille Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL, Bax et Bid).

Strack et coll. (1996) présentent un modèle où la protéine anti-apoptotique Bcl-2 est clivée par une protéase du VIH (Virus de l'Immuno-déficience Humaine), conduisant à l'activation de NFκB, facteur cellulaire indispensable à la transcription virale, et enfin à l'apoptose de la cellule infectée. Dans une autre étude, il a été montré que la protéine anti-apoptotique Bcl-2 pouvait être convertie, par clivage par des caspases, en une protéine effectrice de mort de type Bax (Cheng *et al.,* 1997a). D'autres études rapportent le clivage caspase dépendant de Bcl-2 et Bcl-xL, en réponse à divers stimuli apoptotiques comme le retrait de facteurs de croissance, la liaison de FasL sur son récepteur, le cisplatine ou l'étoposide (Grandgirard *et al.,* 1998 ; Clem *et al.,* 1998 ; Fujita *et al.,* 1998 ; Fujita et Tsuruo, 1998 ; Fadeel *et al.,* 1999b ; Del Bello *et al.,* 2001). Le clivage de Bcl-2 se situe au niveau de la boucle flexible, conduisant à la perte du domaine BH4 et à l'exposition du domaine BH3. La molécula anti-apoptotique est alors convertie en un fragment pro-apototique qui accélère la mort cellulaire (Cheng *et al.,* 1997a ; Fujita et Tsuruo, 1998). L'ensemble des données de la littérature relative au clivage de Bcl-2 suggère que le traitement des cellules par des agents chimiothérapeutiques causant des dommages à l'ADN induit préférentiellement le clivage de Bcl-2 (Fujita et Tsuruo, 1998 ; Fadeel *et al.,* 1999b) alors que les agents agissants sur le cytosquelette induisent une phosphorylation de Bcl-2 (Blagosklonny *et al.,* 1997 ; Haldar *et al.,* 1997). Dans les deux cas, ces modifications post-traductionnelles inactiveraient la fonction anti-apoptotique de Bcl-2.

L'activité de Bax peut également être régulée par clivage par les caspases (Grandgirard *et al.,* 1998), mais aussi par la calpaïne, une protéase activée par le calcium (Wood *et al.,* 1998). Par ailleurs, il a été démontré que la calpaïne clive Bax à son extrêmité N-terminale et génère un fragment pro-apoptotique de 18 kDa (Bax p18) capable d'induire le relargage de cytochrome c et l'apoptose (Gao et Dou, 2000). Bax p18 accélère l'apoptose induite par un stress et une protéase de type cathepsine dégrade rapidement Bax p18 (Cao *et al.,* 2003). En outre, il a été démontré que la forme tronquée Bax p18 se comporte comme une protéine à BH3 seulement de la famille Bcl-2 et que son activité nécessite la présence de Bax p21, la forme non tronquée de Bax (Cartron *et al.,* 2004b).

L'activité de la protéine à BH3 seulement Bid est également régulée par clivage (figure 26). Bid peut être clivée par la caspase 3 (Li H *et al.,* 1998) et par la calpaïne (Chen *et al.,* 2001) ou par la caspase 8 à la suite de l'action du TNFα ou du traitement par le ligand Fas (voie des récepteurs de mort). Le clivage a lieu au niveau du domaine N-terminal de la protéine pro-apoptotique Bid et génère une protéine tronquée (tBid) de 15 kDa qui rejoint la mitochondrie où elle induit l'apoptose en activant les propriétés apoptotiques de Bax ou Bak (Desagher *et al.,* 1999 ; Eskes *et al.,* 2000).

8. 6. 4. Par la localisation sub-cellulaire.

Certaines protéines pro-apoptotiques à BH3 seulement, comme Bim, Bid, Bad et Bmf, sont soumises à des modifications post-traductionnelles qui induisent leur séquestration dans le cytosol, sous forme inactive, par des structures macromoléculaires (Puthalakath et Strasser, 2002).

L'exemple le plus documenté est la séquestration de Bim par la dynéine (figure 26). Bim_{EL} et Bim_{L}, deux isoformes issues d'un épissage alternatif, sont inactivées par séquestration au niveau de la chaîne légère de la dynéine DLC1/LC8, composant du complexe moteur dynéine des microtubules (Puthalakath *et al.,* 1999). A la suite d'une privation en facteurs de croissance, ou de dommages causés par des radiations UV, Bim_{EL} et Bim_{L} sont libérées du complexe moteur dynéine, ce qui leur permet de se lier aux protéines de survie de type Bcl-2.

La protéine pro-apoptotique Bmf est aussi séquestrée par des protéines du cytosquelette d'actine (figure 26). Bmf est inactivée par séquestration au niveau de la chaîne légère de la dynéine DLC2, composant du complexe moteur myosine V (Puthalakath *et al.,* 2001). En réponse à des stimuli comme l'anoïkis (détachement des cellules adhérentes de leurs matrices) ou le traitement avec des drogues dépolymérisant l'actine, Bmf et la chaîne légère de la dynéine DLC2 sont relarguées du complexe moteur myosine V. Ce dernier point suggère que Bmf participe aux modifications de la composition du complexe moteur myosine V.

La translocation de la protéine pro-apoptotique Bax au niveau de la MME est une étape importante dans l'apoptose car elle permet à cette protéine de déclencher la mort cellulaire

(Wolter *et al.,* 1997). Bax est présente dans les cellules saines sous forme soluble et son changement conformationnel permet à cette protéine de s'insérer dans la MME et d'induire l'apoptose (Hsu YT *et al.,* 1997). Plus précisémment, la dimérisation de Bax permet sa translocation mitochondriale et l'induction consécutive de l'apoptose (Hsu et Youle, 1997 ; Gross *et al.,* 1998). Une étude récente montre la protéine vMIA du cytomégalovirus recrute la protéine Bax au niveau de la mitochondrie et bloque ainsi son activité pro-apoptotique (Poncet *et al.,* 20004 ; Arnoult *et al.,* 2004). Les mécanismes de régulation et d'activation de la protéine Bax sont discutés plus en détail § **II - 2** et § **II - 3**.

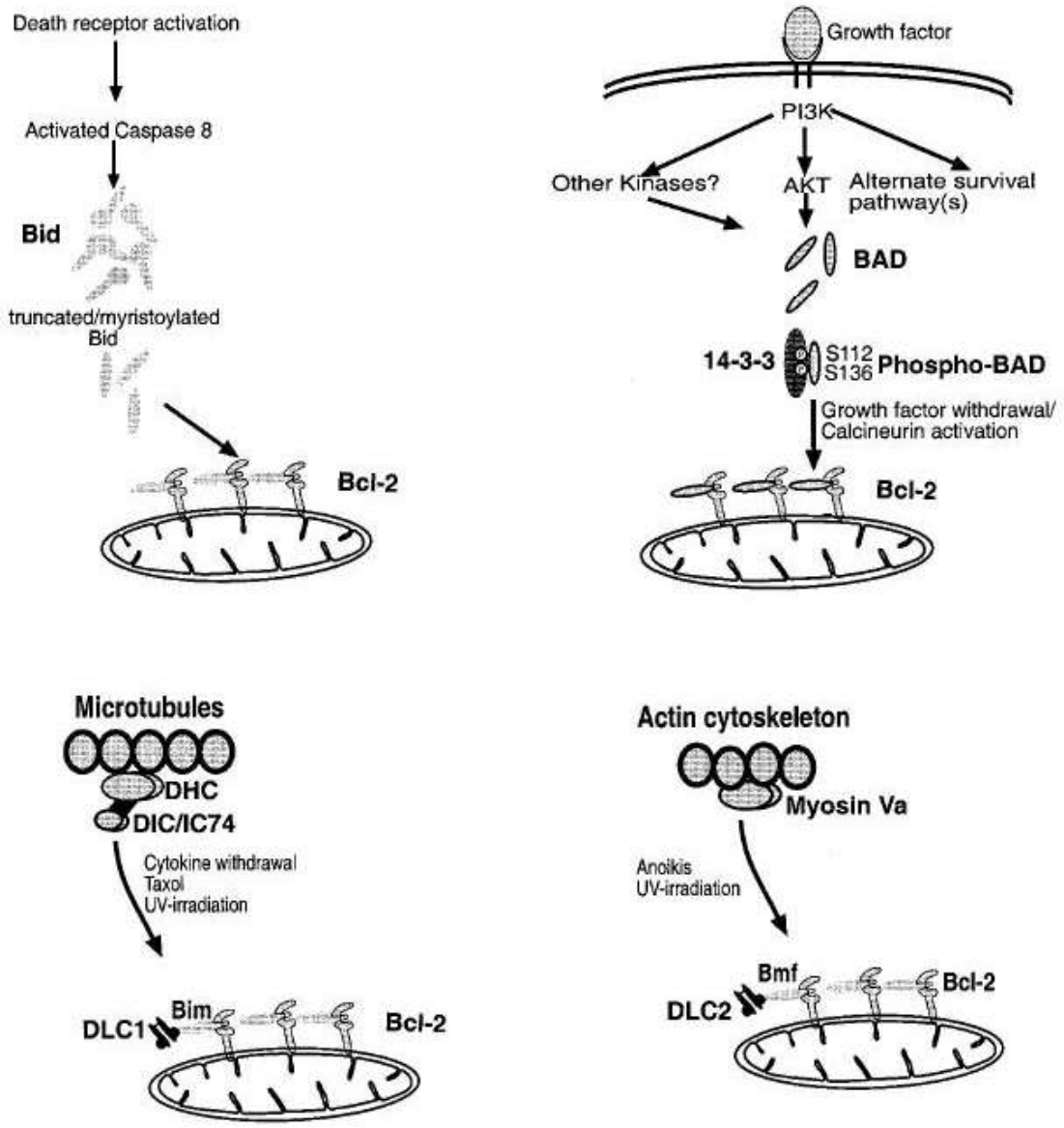


Figure 26 : Modèles de régulation post-traductionnelle des protéines à BH3 seulement Bad, Bid, Bim et Bmf (figure tirée de Puthalakath et Strasser, 2002).

8. 6. 5. Par régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle.

Certains membres de la famille Bcl-2 sont régulés au niveau transcriptionnel.

L'expression des gènes *bax* (Miyashita et Reed, 1995), *bcl-2* (Wu *et al.,* 2001), *puma* (Nakano et Vousden, 2001 ; Han *et al.,* 2001) *et noxa* (Oda *et al.,* 2000) est régulée au niveau transcriptionnel par la protéine suppresseur de tumeur p53.

La région promotrice du gène *bax* contient quatre motifs ayant une homologie avec la séquence consensus de fixation du facteur de transcription p53 (Miyashita et Reed, 1995). p53 est capable de transactiver l'expression d'un gène rapporteur qui est sous le contrôle du promoteur de *bax*, suggérant que *bax* est un gène cible de p53. Le gène *bcl-2* possède une séquence TATA dans sa région promotrice minimale qui est la cible de p53, et l'interaction de p53 avecla TBP (TATA Binding Protein) semble être responsable de la repression de l'expression de *bcl-2* dans les cultures de cellules hématopoïétiques (Wu *et al.,* 2001). La surexpression de *bcl-2* dans certains lymphômes de type B pourrait ainsi être expliquée par le rôle joué par les mutations de p53.

En réponse aux dommages à l'ADN, l'expression des ARNm de Noxa et PUMA (p53 upregulated modifying of apoptosis) est induite par p53 dans les thymocytes, où la mort cellulaire est induite consécutivement, et dans les fibroblastes, où le cycle cellulaire est arrêté consécutivement (Oda *et al.,* 2000 ; Nakano et Vousden, 2001 ; Yu *et al.,* 2001 ; Han *et al.,* 2001). L'expression de l'ARNm de PUMA est aussi induite dans les thymocytes traîtés au dexaméthasone (Han *et al.,* 2001), induisant la mort des cellules lymphoïdes de manière p53-dépendante. Ainsi, il semble que l'expression de PUMA peut être induite par des stimuli de stress agissant au travers d'une variété de régulateurs transcriptionnels.

Les protéines pro-apoptotiques à BH3 seulement Hrk/DP5 (Inohara *et al.,* 1997a ; Imaizumi *et al.,* 1997 et 1999) et Bim (Putcha *et al.,* 2001 ; Whitfield *et al.,* 2001 ; Dijkers *et al.,* 2000 ; Shinjyo *et al.,* 2001) sont également soumises à une régulation transcriptionnelle. Au cours de l'embryogenèse, l'expression de Hrk/DP5 est induite dans les tissus neuronaux qui contiennent un grand nombre de cellules apoptotiques (Imaizumi *et al.,* 1997). Dans les cultures de cellules neuronales, la privation de NGF ou le traitement avec la protéine amyloïde b (Ab) induisent la surexpression de l'ARNm de Hrk/DP5 avec un pic lorsque ces cellules vont mourir (Imaizumi *et al.,* 1997). Le contrôle transcritionnel de Bim semble plus complexe, puisque divers modes de régulation ont été rapportés dans différents systèmes cellulaires. Il semble ainsi que la régulation de *bim* dépend du type cellulaire. La privation en facteurs de croissance cause l'augmentation de

l'expression du gène *bim* dans les cellules neuronales où l'activation de JNK est nécessaire (Putcha *et al.,* 2001 ; Whitfield *et al.,* 2001) et dans les cellules hématopoïétiques où l'activation du facteur de transcription FKHR-L1 est nécessaire (Shinjyo *et al.,* 2001 ; Dijkers *et al.,* 2000). D'autres études révèlent que la stimulation avec la cytokine (IL-3) réprime l'expression de *bim via* l'activation de la voie MAPK et/ou de la voie phosphatidylinositol 3' (PI3) kinase dans les cellules hématopoïétiques (Shinjyo *et al.,* 2001). De manière intéressante, dans les cultures de cellules neuronales privées de NGF, seule l'isoforme Bim_{EL} est surexprimée (Putcha *et al.,* 2001 ; Whitfield *et al.,* 2001). Comme les trois isoformes de Bim (Bim_{EL}, Bim_L et Bim_S) sont synthétisées à partir de même transcrit, la prépondérance de la forme Bim_{EL} doit être dûe à une régulation au niveau de l'épissage du pré-ARNm, en plus de la régulation transcriptionnelle.

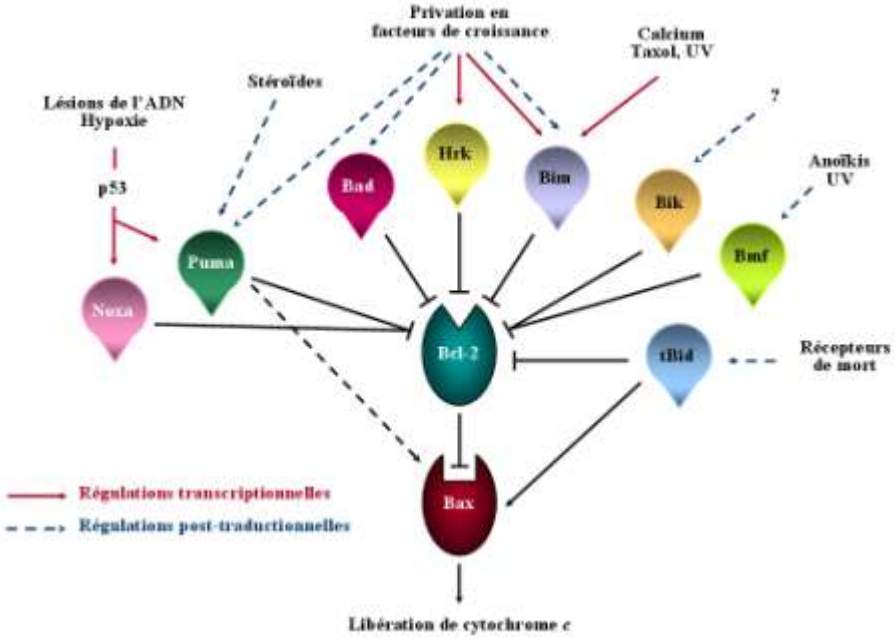


Figure 27 : Les membres pro-apoptotiques à BH3 seulement de la famille Bcl-2 : détecteurs de différents stimuli apoptotiques et mécanisme de régulation.

En collectant les informations concernant les différents modes de régulation des protéines à BH3 seulement, on peut s'apercevoir que différents types cellulaires requièrent différentes protéines à BH3 seulement pour activer la mort cellulaire programmée. Ces données suggèrent également que pour un type cellulaire donné, différentes protéines à BH3 seulement sont requises pour activer l'apoptose en réponse à différentes conditions de stress et stimuli de mort (figure 27).

gène	Anomalie(s) du développement	Défaut(s) d'apoptose	Références
bcl-2	Viables à la naissance mais une majorité meurent après la naissance/les souris deviennent grises à l'âge de 5-6 semaines dûe à une diminution de la survie de leurs mélanocytes.	Insuffisance rénale sévère dûe à un nombre diminué de néphrons/chute progressive du nombre de leurs lymphocytes dûe à une incapacité à maintenir l'homéostasie/apoptose massive du thymus et de la rate.	Veis *et al.,* 1993 ; Nakayama *et al.,* 1994 ; Kamada *et al.,* 1995
bcl-x	Létal au stade embryonnaire E13.	Apoptose massive au niveau du cerveau, de la moelle épinière, du foie et du thymus/ mort cellulaire massive des cellules hématopoïétiques et des neurones	Motoyama *et al.,* 1995
bcl-w	Viable. Non essentiel pour le développement de l'organisme.	Les femelles ont des fonctions reproductrices normales mais les mâles sont infertiles en raison d'une apoptose massive des cellules au niveau du tube séminifère.	Print *et al.,* 1998
bid	Viable. Non essentiel pour le développement de l'organisme.	Mort hépatocellulaire diminuée en réponse à l'administration d'anti-corps anti-Fas *in vivo*.	Yin *et al.,* 1999
bax	Viable. Non essentiel pour le développement de l'organisme.	Mâle stérile en raison d'une apoptose massive des cellules germinales/ovaires avec excès cellulaires dans les follicules primaires/augmentation du nombre de neurones sympathiques et de motoneurones/les neurones isolés à partir de ces souris prolifèrent en absence de facteur de croissance.	Knudson *et al.,* 1995 ; Deckwerth *et al.,* 1996
bak	Viable. Non essentiel pour le développement de l'organisme.	Fonctions reproductrices normales/les cellules isolées de ces souris prolifèrent normalement	Lindsten *et al.,* 2000
bax bak	Mortalité périnatale : seul 10% des souris survivent jusqu'à l'âge adulte/persistence des membranes interdigitales/méat vaginal non perforé/nombreuses anomalies neurologiques (surdité, anomalies comportementales)	Accumulation d'excès cellulaires dans le système nerveux central et dans le système hématopoïétique (entraînant splenomégalie, lymphadénopathie et infiltration lymphoïde des organes périphériques)/les cellules isolées de ces souris sont résistantes à la mort cellulaire induite par irradiation ou par l'étoposide mais sensibles à la mort induite par Fas	Lindsten *et al.,* 2000

Tableau 9 : Quelques mutations connues de gènes de protéines de la famille Bcl-2 chez la souris et leurs effets en terme de développement et de défaut d'apoptose.

Les protéines anti-apoptotiques Mcl-1 (Kozopas *et al.,* 1993), Bcl-xL (Boise *et al.,* 1995), A-1 (Lin *et al.,* 1993 ; Grumont *et al.,* 1999 ; Zong *et al.,* 1999), et plus rarement Bcl-2 (von Freeden-Jeffry *et al.,* 1997) sont aussi régulées transcriptionnellement. Cependant, par soucis de concision, je ne détaillerai pas ces derniers points dans ce manuscrit.

8. 7. Invalidation génique.

Les effets, en terme de développement et de défaut d'apoptose, des mutations par invalidation de gène ou « knock-out » de certains gènes de la famille Bcl-2 sont résumés dans le tableau 9.

8. 8. Régulation de la voie intrinsèque de l'apoptose par les membres de la famille Bcl-2.

8. 8. 1. Propriété de formation de canaux.

Nous avons vu précédemment que la structure de certaines protéines de la famille Bcl-2 est similaire à celle de toxines bactériennes qui sont capables de former des pores ou des canaux transmembranaires (Muchmore *et al.,* 1996). Il a été montré que Bcl-xL, Bcl-2 et Bax sont capables de former des canaux dans les membranes lipidiques (Minn *et al.,* 1997 ; Schendel *et al.,* 1997 ; Antonsson *et al.,* 1997), ce qui est en accord avec les données structurales. Les canaux formés par les membres de la famille Bcl-2 sont décrits comme des canaux multiconductances, sensibles au pH et voltage-dépendants. Une conductance assez large (>1nS) a été rapporté pour Bax et Bcl-2.

Néanmoins, les propriétés de formation de canaux des protéines anti- et pro-apoptotiques ne sont pas identiques. Bcl-2 et Bcl-xL sont des canaux sélectifs des cations (Antonsson *et al.,* 1997 ; Schendel *et al.,* 1997 ; Schlesinger *et al.,* 1997 ; Minn *et al.,* 1997), tandis que le canal généré par Bax est sélectif des anions (Antonsson *et al.,* 1997 ; Schlesinger *et al.,* 1997) à pH physiologique. Des différences dans la composition en acides aminés des hélices $\alpha 5$ et $\alpha 6$ pourraient expliquer la différence des propriétés électrophysiologiques des canaux formés par les protéines anti- et pro-apoptotiques. Les conditions requises pour la formation des canaux diffèrent également pour les protéines anti- et pro-apoptotiques. Bax peut former des canaux à pH neutre, tandis que Bcl-2

requiert un pH acide. En outre, la formation de canaux par Bax est dépendante de la composition en lipides de la membrane. Dans les membranes composées de lipides non chargés comme la phosphatidylcholine ou le cholestérol, aucune formation de canaux n'est détectée. En revanche, les phospholipides chargés négativement comme la phosphatidylsérine permettent à Bax de former des canaux. Ainsi, un mécanisme possible de régulation de la formation des canaux réside dans la composition du microenvironnement de la membrane mitochondriale (Antonsson et Martinou, 2000).

La formation de pores par Bax n'a lieu que si Bax s'oligomérise (Lewis *et al.,* 1998 ; Antonsson *et al.,* 2000). Cette oligomérisation est le résultat d'un changement conformationnel de Bax, suite à l'activation par tBid et probablement par d'autres protéines à BH3 seulement (Desagher *et al.,* 1999), ce qui lui permet de s'insérer dans la MME (Eskes *et al.,* 2000). Néanmoins, une étude montre que la protéine Bid clivée par la caspase 8 n'est pas capable à elle seule d'induire l'oligomérisation de Bax dans les membranes lipidiques. En revanche, tBid est capable de s'associer avec Bax pour former un canal ionique (Roucou *et al.,* 2002a et 2002b). Enfin, la protéine Bid clivée par la caspase 8 est capable de former elle-même des canaux multiconductances et sensibles au pH dans les membranes lipidiques (Schendel *et al.,* 1999).

Les protéines de la famille Bcl-2 sont capables non seulement de former des canaux ioniques mais également de former des canaux ou participer à la formation de canaux pour permettre la libération de cytochrome *c* de la mitochondrie. C'est la cas notamment de Bax (Eskes *et al.,* 1998 ; Jurgensmeier *et al.,* 1998). De plus, une autre étude montre que des produits pro-apoptotiques issus du clivage de Bcl-xL forment des canaux perméables au cytochrome *c* dans les membranes lipidiques (Basanez *et al.,* 2001). En outre, une étude d'immunoélectroscopie a permis de mettre en évidence la présence de larges groupes de Bax autour de la mitochondrie aussi bien dans les cellules sur-exprimant Bax mais aussi dans les cellules soumises à un stress apoptotique (Nechushtan *et al.,* 2001).

L'ensemble de ces données convergent vers l'hypothèse que Bax pourrait s'oligomériser et s'insérer dans la MME pour former un pore permettant la libération de cytochrome *c*.

8. 8. 2. Modèles de perméabilisation de la mitochondrie.

L'activation des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak aboutit à leur oligomérisation dans la MME et précède la libération de cytochrome c. La relation entre ces deux évènements implique

une étape de perméabilisation de la MME dont le déroulement est à l'heure actuelle mal établi et s'explique par deux hypothèses : la rupture physique non spécifique de la MME ou la formation de pores spécifiques dans la MME (Lim *et al.,* 2002). En tout, cinq modèles de perméabilisation de la MME sont proposés (Desagher et Martinou, 2000) et sont illustrés figure 28. Je discuterai de ces points dans le § **II - 3**.

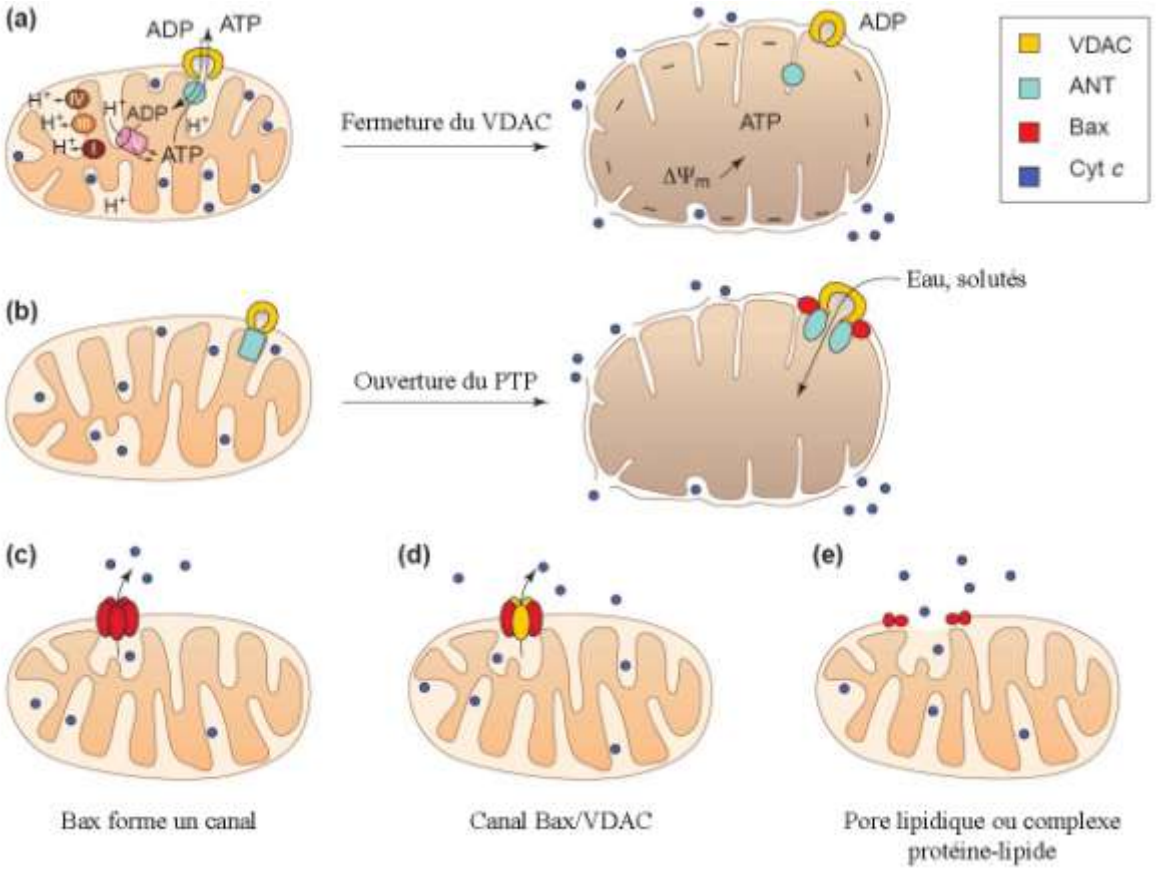


Figure 28 : Cinq modèles de relargage du cytochrome *c* de la mitochondrie au cours de l'apoptose (figure tirée de Desagher et Martinou, 2000). (a,b) Le gonflement de la matrice mitochondriale cause la rupture de la MME, permettant ainsi le relargage, à partir de l'espace intermembranaire, de cytochrome *c* et d'autres proteines apoptogènes. Le modèle (a) implique la fermeture du VDAC (voltage-dependent anion channel) et l'altération des échanges ATP-ADP. En condition normale (à gauche), les protons qui s'accumulent dans l'espace intermembranaire suite au transport d'électrons rentrent dans la matrice mitochondriale à travers la F1F0ATPase (complexe V de la chaîne respiratoire). En inhibant la F1F0ATPase , l'altération des échanges ATP-ADP conduit à l'accumulation de protons dans l'espace intermembranaire et à l'augmentation du potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\Psi$m) qui est connu pour promouvoir le gonflement osmotique (à droite). Le modèle (b) suggère que le pore de transition de perméabilité (PTP) s'ouvre et que la perméabilité de la MMI augmente, causant le gonflement de la matrice mitochondriale. Bax induirait l'ouverture de ce pore en se liant à l'ANT (Bax might adenine-nucleotide translocator) au niveau de sites de contact entre les membranes interne et externe ou après translocation à la membrane interne. (c-e) Un grand canal se forme dans la MME, permettant le relargage de cytochrome *c* sans porter atteinte à l'intégrité de la mitochondrie. Ce canal pourrait être formé par Bax (c), par Bax en association avec le VDAC (d) ou pourrait être un canal lipidique ou un complexe lipide-protéine (e) formé après l'insertion de Bax dans la MME.

En définitive, les membres de la famille Bcl-2 exercent deux fonctions essentielles : ils participent d'une part à la formation de pores régulant le passage d'ions et de certaines substances activatrices de l'apoptose et d'autre part modulent la fonction des molécules régulatrices de l'apoptose par l'intermédiaire d'interactions protéine-protéine.

II. LA PROTEINE PRO-APOPTOTIQUE BAX AU SEIN DE LA VOIE MITOCHONDRIALE.

Bax est une protéine centrale dans la signalisation apoptotique : des souris knock-out (*bax*-/-) montrent en effet que cette protéine présente des fonctions anti-tumorigènes (Yin *et al.,* 1997) et qu'elle est indispensable pour induire la mort cellulaire programmée de certaines cellules (neurones, lymphocytes, spermatogonies et cellules granuleuses ovariennes) au cours du développement embryonnaire (Knudson *et al.,* 1995) (voir aussi tableau 9 au § **I – 8. 7.**). De plus elle est le principal médiateur de la mort cellulaire dépendante de p53, qui peut activer sa transcription (McCurrach *et al.,* 1997 ; Reed, 1998). Enfin, alors que l'absence combinée de Bax et Bak se traduit dans les fibroblastes embryonnaires de souris par une résistance des cellules à divers stimuli apoptotiques (Wei *et al.,* 2001), la seule absence de Bax dans les cellules épithéliales cancéreuses humaines suffit à bloquer l'apoptose induite par divers stimuli (Bid, Bik, TNF, anti-Fas, UV, staurosporine, thapsigargine) (Theodorakis *et al.,* 2002) (voir tableau 9). L'ensemble de ces données explique pourquoi la présence de mutations sur ce gène est en relation directe avec l'apparition de tumeurs cancéreuses ou bien avec l'apparition de tumeurs résistantes aux traitements chimiothérapeutiques. Ce point sera discuté plus en détail au § **III.**

1. Généralités et structure.

La protéine Bax (Bcl-2 associated protein X), nommée Bax α, a été découverte en 1993 par l'équipe de Korsmeyer qui recherchait des partenaires potentiels de la protéine Bcl-2, oncogène impliqué dans les lymphômes folliculaires humains caractérisés par la translocation chromosomique t(14 ;18) (Oltvai *et al.,* 1993 ; Bakhshi *et al.,* 1985).

La protéine Bax est codée au niveau nucléaire par un gène de 6920 pb localisé entre les locus q13.3 et q13.4 du chromosome 19 (Apte *et al.,* 1995). Le gène codant pour Bax est transcrit en un ARNm composé de 6 exons correspondant à un ADNc de 579 pb et qui est traduit en une protéine de 192 acides aminés pesant 21 kDa. Outre la présence des 3 domaines d'homologies BH1, BH2 et BH3, l'analyse de la structure de Bax par spectroscopie à résonance magnétique nucléaire (RMN) montre l'existence de 9 hélices α (figure 29) (Suzuki *et al.,* 2000) : 8 hélices sont quasi-communes avec celles de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL ; la neuvième hélice est hydrophobe et est localisée au niveau de l'extrêmité C-terminale (figure 30 et 31).

La protéine Bax, joue un rôle central dans la signalisation apoptotique et est présente dans de nombreux tissus comme le thymus, la rate, le colon, les glandes salivaires et les testicules mais est plus abondamment exprimée dans le foie, les reins, le pancréas, les glandes gastriques, le cœur, le cerveau et la moelle osseuse (Penault-Llorca *et al.,* 1998).

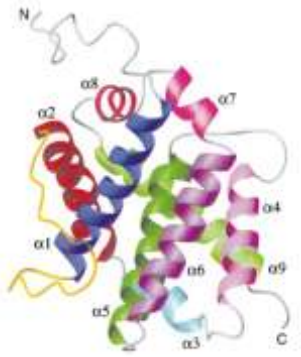


Figure 29 : Structure tridimensionnelle de Bax (figure tirée de Suzuki *et al.,* 2000).

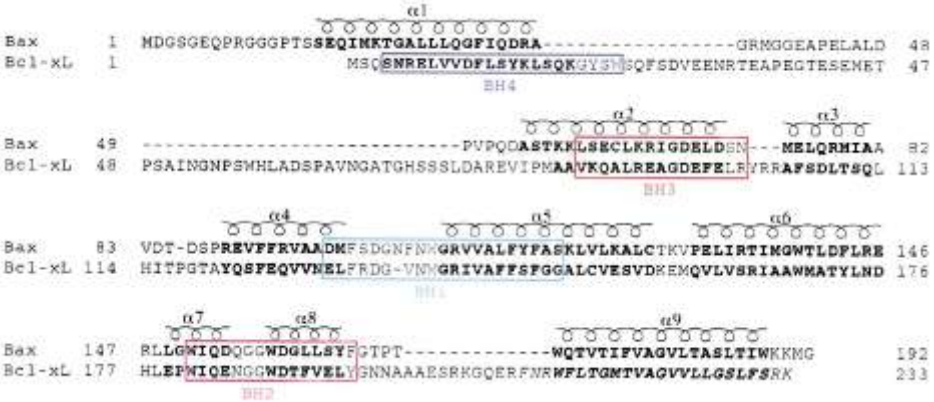


Figure 30 : Comparaison des séquences en acides aminés de Bax et de Bcl-xL (figure tirée de Suzuki *et al.,* 2000). Les séquences homologues sont alignées. Les positions des domaines d'homologie BH (rectangles de couleur) et des hélices α sont indiquées.

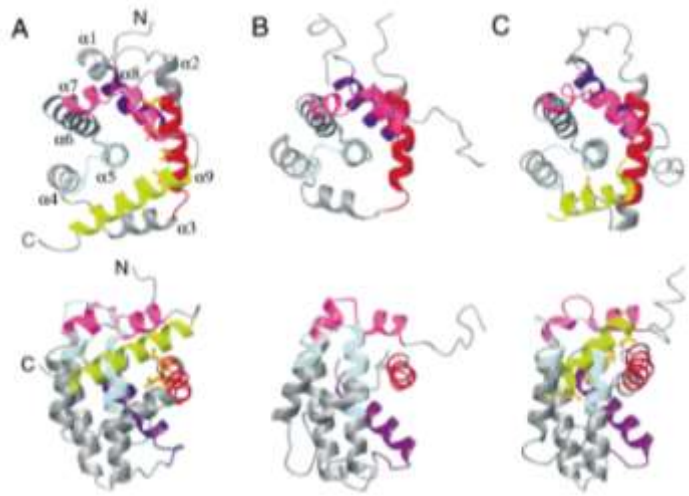


Figure 31 : Comparaison des structures de Bax et Bcl-xL (figure tirée de Suzuki *et al.,* 2000). Deux vues différentes de Bax (A), Bcl-xL (B) et Bcl-xL complexé au peptide BH3 de Bak (C) sont présentées, vue plongeante vers l'hélice α5 centrale (panel du haut) et vue latérale (panel du bas). Les domaines BH1, BH2, BH3 et BH4 sont indiqués en cyan, magenta, rouge et bleu respectivement. L'hélice α1 de Bax, qui correspond à l'hélice de Bcl-xL contenant le domaine BH4, est représentée en pourpre. L'hélice en C-terminal de Bax et le peptide BH3 de Bak sont représentés en vert. Les 24 résidus C-terminaux de Bcl-xL sont délétés pour les études structurales de Bcl-xL complexé ou non.

2. Isoformes de Bax.

A l'heure actuelle, neuf isoformes issues d'un épissage alternatif de l'ARNm Bax (Bax α, β, γ, τ, δ, ω, ε, ϕ, σ, κ) (Oltvai *et al.,* 1993 ; Apte *et al.,* 1995 ; Zhou *et al.,* 1998 ; Thomas *et al.,* 1999 ; Shi *et al.,* 1999 ; Schmitt *et al.,* 2000 ; Jin *et al.,* 2001) et une isoforme issue du même gène mais traduite à partir d'un ARNm distinct (Bax ψ) (Cartron *et al.,* 2002b) ont été caractérisées et décrites. Cependant, Bax α (que l'on nommera Bax par défaut) reste à ce jour la forme la plus étudiée et la mieux connue.

Outre Bax, Oltvai et coll. (1993) ont caractérisé deux autres isoformes, issues de transcrits alternatifs, nommées **Bax β et Bax γ**. Bax β est une protéine de 214 acides aminés pesant 24 kDa et est codée par un ARNm de 1,5 kb composé des exons 1, 2, 3, 4, 5, de la persistance de l'intron 5 et de l'exon 6. Ainsi, l'extrêmité C-terminale de Bax β est codée par une partie de l'intron 5 et non par l'exon 6 comme dans l'isoforme α. Bax γ est une protéine pesant 4,5 kDa codée par un ARNm de 1,5 kb composé des exons 1, 3, 4, 5 et 6 ainsi que de l'épissage alternatif de l'intron 5. La perte de l'exon 2 entraîne un décalage de cadre de lecture qui interrompt la traduction de la protéine à l'exon 3 d'où une protéine de 41 acides aminés ne possédant aucun des domaines fonctionnels de Bax α.

Apte et coll. (1995) ont caractérisé l'isoforme **Bax δ** qui est codée par un ARNm où l'exon 3 est absent d'où une protéine de 143 acides aminés. D'un point de vue structure/fonction, seul le domaine BH3 fait défaut à Bax δ par rapport à Bax α.

Zhou M et coll. (1998) décrivent l'isoforme **Bax ω** qui est codé par un ARNm composé des exons 1, 2, 3, 4, 5, de l'intron 5 et de l'exon 6. Bax ω est une protéine de 221 acides aminés déficiente de l'équivalent de l'extrêmité C-terminale de Bax.

Shi et coll. (1999) caractérisent un nouveau variant issu d'un épissage alternatif, **Bax ε**, une protéine de 18 kDa déficiente du domaine BH2 et de l'extrêmité C-terminale de Bax.

Thomas et coll. (1999) identifient deux nouveaux variants issus de l'épissage alternatif du pré-ARNm de Bax. Le premier, nommé **Bax ε**, est une protéine de 12 kDa codée par un ARNm de 430 pb où il manque les exons 2 et 3, le reste étant identique à la forme α. Le second variant, nommé **Bax** ϕ, est une protéine de 24 kDa codée par un ARNm de 620 pb : 49 pb supplémentaires sont insérées entre les exons 5 et 6 par rapport à la forme α

Notons que Shi et Thomas ont caractérisé deux isoformes différentes de Bax mais les ont publiés simultanément sous le nom de Bax ε.

Schmitt et coll. (2000) décrivent un autre variant issu de l'épissage alternatif, **Bax σ**, protéine où il manque 13 acides aminés entre le domaine BH2 et le domaine transmembranaire (TM) par rapport à la forme α.

Jin et coll. (2001) décrivent l'isoforme **Bax κ** comme étant le produit d'un épissage alternatif du gène *bax* au niveau de l'exon 1. Au niveau protéique, Bax κ, tout comme Bax ψ, équivaut à une forme délétée en son extrêmité N-terminale et conserve, en revanche, tous les autres domaines caractéristiques de Bax. Bax κ est comparable à la protéine recombinante BaxΔART (Bax délétée de ses 19 premiers acides aminés en N-terminal) (Goping *et al.,* 1998). De plus, Bax κ est capable de promouvoir la mort au sein de neurones.

Dans notre laboratoire, Cartron et coll. (2002b) rapportent l'existence d'une nouvelle forme de Bax, **Bax ψ**, qui est présente chez 24 % des patients atteints de glioblastome multiforme. Bax ψ est une forme tronquée de sa partie N-terminale due à la délétion partielle de l'exon 1 du gène *bax*. Ainsi, les protéines Bax ψ et Bax α sont issues du même gène mais sont codées par des ARNm distincts et sont présentes dans les tissus normaux. Cependant, les tumeurs gliales expriment soit la forme α, soit la forme ψ, résultat probable de la transcrition exclusive de l'ARNm correspondant, suggérant un profil de méthylation distinct du gène *bax*. Bax ψ est

préférentiellemnt localisée à la mitochondrie et est plus apoptogène que Bax α. De façon intéressante, l'expression de Bax ψ corrèle avec une survie plus longue des patients par rapport aux patients Bax α (18 mois contre 10). Ces résultats mettent en avant pour la première fois l'effet bénéfique d'un variant de Bax dans la progression tumorale.

D'un point de vue caractérisation fonctionnelle, aucune étude n'a été réalisée avec les isoformes β, γ, δ et la forme ε définie par Thomas et coll. (1999). En revanche, dans des cellules E5 de singe, il apparaît que Bax ω est plus apoptogène que Bax α (Zhou *et al.,* 1998). Les isoformes Bax ϕ (Thomas *et al.,* 1999), Bax ε (Shi *et al.,*1999) et Bax σ (Schmitt *et al.,* 2000) possèdent des activités apoptogéniques comparables à celles de Bax α. Enfin, Bax κ (Jin *et al.,* 2001) apparaît plus apoptogène que Bax α, tout comme le sont Bax ψ (Cartron *et al.,* 2002b) et BaxΔART (Goping *et al.,* 1998).

En définitive, l'expression de différents variants de Bax, avec des domaines fonctionnels manquants ou supplémentaires, représente un autre niveau de régulation de la fonction de Bax et par conséquence de l'apoptose.

3. Mécanismes de régulation de Bax, d'adressage à la mitochondrie et perméabilisation de la MME.

En condition normale, Bax est présente sous une forme inactive dans le cytosol. Suite à un stimulus apoptotique, Bax subit des changements conformationnels et est transloquée à la mitochondrie où elle induit le relargage de cytochrome *c*. L'activation de la protéine Bax constitue une étape centrale et essentielle de la phase précoce de l'apoptose. Dans la revue qui suit (Er *et al.,* 2006), nous discutons des facteurs impliqués dans le changement conformationnel de Bax et de la fonction des différents domaines de Bax impliqués dans l'adressage et l'insertion de Bax à la mitochondrie. Nous dicutons également des mécanismes moléculaires des différents modèles de perméabilisation de la MME au cours de l'apoptose.

Revue 1 : Mitochondria as the target of the pro-apoptotic protein Bax.

Er E, Oliver L, Cartron PF, Juin P, Manon S, Vallette FM.

Biochim Biophys Acta. (2006)

Revue 1

MITOCHONDRIA AS THE TARGET OF THE PRO-APOPTOTIC PROTEIN BAX

"Life is pleasant, death is peaceful. It's the transition that's troublesome" (Isaac Asimov)

Emine Er[1], Lisa Oliver[1], Pierre-François Cartron[1], Philippe Juin[1], Stéphen Manon[2] and François M. Vallette[1*]

[1] UMR 601 INSERM, Université de Nantes, 9 Quai Moncousu F-44035 Nantes. Cedex 01 France.
[2] UMR 5095 CNRS, Université Bordeaux 2, 1 rue Camille Saint Saëns F-33077 Bordeaux. France

*Corresponding author: UMR 601 INSERM, 9 Quai MONCOUSU F-44035 Nantes. Cedex 01-France. tel: 33-240084081; fax:33-240084082; e-mail: francois.vallette@univ-nantes.fr

Keywords: apoptosis, Bax, activation, conformational change, addressing/targeting, permeabilization, mitochondrion.

Abbreviation: adenosine nucleotide translocator (ANT), Apoptosis inducing factor (AIF), Apoptosis Regulation of Targeting (ART), Bax-deficient Glioblastoma Multiforme (BdGBM), Bax interacting factor 1 (Bif-1), Bcl-2 homology (BH), BH3-only proteins (BOPs), extra long isoform of Bim (BimEL), green fluorescent protein (GFP), α helix (Hα), Humanin (Hn), Mitochondrial Apoptosis-induced Channel (MAC), mitochondrial change in potential ($\Delta\psi m$), mitochondrial permeability Transition Pore (mPTP), outer mitochondrial membrane (OMM), phosphatidylinositol 3 (PI3), truncated form of Bid (tBid), voltage dependent anionic channel (VDAC).

SUMMARY

During apoptosis, engagement of the mitochondrial pathway involves the permeabilization of the outer mitochondrial membrane (OMM), which leads to the release of cytochrome c and other apoptogenic proteins such as Smac/DIABLO, AIF, EndoG, Omi/HtraA2 and DDP/TIMM8a. OMM permeabilization depends on activation, translocation and oligomerization of multidomain Bcl-2 family proteins such as Bax or Bak. Factors involved in Bax conformational change and the function(s) of the distinct domains controlling the addressing and the insertion of Bax into mitochondria are described in this review. We also discuss our current knowledge on Bax oligomerization and on the molecular mechanisms underlying the different models accounting for OMM permeabilization during apoptosis.

Apoptosis is a cell death program that is central to cellular and tissue homeostasis, involved in many physiological and pathological processes [1]. The proteins of the Bcl-2 family are key regulators of this program and their main function is to control mitochondrial permeability and particularly, the release of apoptogenic proteins from this organelle [2].

The Bcl-2 family of proteins can be divided into three groups based on their structure and their role in apoptosis (**figure 1**):

- The anti-apoptotic proteins like Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl-1, NR-13, Boo/Diva/Bcl-2-L-10, Bcl-B, E1B 19K (adenovirus), BHFR1 (Epstein Barr virus), CED-9 (*C. elegans*). These proteins are characterized by the presence of four Bcl-2 homology domains (BH: BH1, BH2, BH3 and BH4) (**figure1**).
- The pro-apoptotic proteins such as Bax, Bak, Bok/Mtd and Bcl-Xs, which contain three homology domains BH1, BH2 and BH3.
- The BH3-only proteins (BOP), which include Bid, Bad, Noxa, Puma, Bmf, BimL/Bod, Bik/Nbk, Blk, Hrk/DP5, Bnip3 and Bnip3L. These proteins induce apoptosis by activating pro-apoptotic proteins like Bax or by inhibiting anti-apoptotic proteins like Bcl-2.

Most of these proteins contain a C-terminal hydrophobic α-helix, which is a potential transmembrane domain involved in their localization to the membranes of organelles such as the mitochondria, the endoplasmic reticulum and the nucleus [3,4]. These proteins can form homo-dimers and/or hetero-dimers [5,6], essentially through the interaction of their BH3 domain [7].

The BH4 domain that corresponds to the first α helix (Hα1) of anti-apoptotic proteins (**figure 1**) is implicated in the control of their anti-death functions [8,9].

1. Cellular localization of Bax

The activation of Bax during apoptosis usually does not require an increase transcription of its gene. Cell fractionation and confocal microscopy showed a preferential cytosolic localization of Bax in most cells in spite of the presence of the C-terminal putative transmembrane domain similar to that of Bcl-2 [10-12]. NMR data on the 3-D structure of soluble Bax showed that the C-terminal hydrophobic Hα9 is bent in a hydrophobic groove. Although Hα9 is essentially composed of hydrophobic amino acids, it also contains several polar amino acids (Thr172, Thr174, Thr182, Ser184, Thr186). Except Ser184, all are exposed to the solvent and thus may contribute to the solubility of Bax in this conformation [13]. On the other hand, the N-terminus is also essential to keep the cytosolic conformation of Bax as a deletion of the first 20 amino acids results in a constitutive mitochondrial localization [14, 15]. However, the cytosolic localization of Bax has not been unanimously observed and some groups describe a constitutive mitochondrial localization of Bax in healthy cells [16]. Of note, the activation of mitochondria-bound Bax requires additional partners such as c-myc-regulated elements [17, 18], and thus can be dissociated from the mitochondrial addressing step, at least in some cells.

1.1. Induction of apoptosis causes the translocation of Bax to the OMM

The mitochondrial form of Bax found in non-apoptotic cells is a 21 kDa monomer weakly associated with the OMM or soluble in the cytosol. Upon the induction of apoptosis, this monomer evolves into a high molecular complex (96 to 260 kDa) inserting into the OMM, suggesting that an oligomerization accompanies this insertion [see for example 19-21]. These complexes appear to be homo-oligomers of 6 to 8 molecules of Bax as observed in gel-filtration assays on isolated mitochondria. This oligomerization seems to be an important step in the activation of Bax. Electron microscopy indicates that Bax translocation to the OMM is the first step in Bax activation and that the mitochondria-associated oligomer, is the biologically active pro-apoptotic structure [22].

1.2. Bax conformational changes, addressing to mitochondria and insertion into the OMM

Data have shown that the BH3 domain of inactive/soluble Bax is inaccessible for the oligomerization events [13]. Indeed, Bax translocation to the OMM during apoptosis assumes the unfolding of the Hα9 from its hydrophobic groove and a change in the conformation in the N-terminus of the protein [23]. Thus, Bax would undergo one or more conformational change(s) during its activation leading to its anchoring in the OMM and its oligomerization. Two models have been proposed to explain the activation of Bax during apoptosis. The first model suggests that Bax, constitutively associated with the OMM, undergoes a conformational change upon induction of apoptosis leading to oligomer formation and anchoring into the OMM [16]. The second model suggests that a conformational change in Bax occurs in the cytosol resulting in the opening of the C-terminal Hα9 causing the exposure of the pore forming domain Hα5-Hα6 and probably also the accessibility of the BH3 domain and only then Bax is addressed to the mitochondria through its N-terminus [24] or its C-terminus [25, 26]. Recently, Annis *et al*. [27] showed that Bax is actually inserted into membranes as a monomer implying that the insertion step occurs prior to oligomerization.

The hydropathy profile of Hα9 suggests that it could be a putative anchoring domain. The role of these 21 amino acids in the C-terminal domain was first studied by deletion mutagenesis. Studies based on the cellular localization of the fusion protein green fluorescent protein (GFP)-BaxΔC showed that a deletion of 21, 10 or 5 amino acids from the C-terminal generates a protein that is strictly cytosolic under apoptotic conditions [11, 23]. These data suggest that the Hα9 plays an essential role in anchoring Bax into the OMM. The crucial role of the conformation of Hα9 was investigated by analyzing different substitutions at Ser184, the polar residue in Hα9 facing the protein core. A substitution by Asp, Gln or Lys generates a protein exclusively cytosolic whereas the deletion of Ser184 or a substitution by Val or Ala produces to a cytotoxic protein exclusively localized to the OMM [23]. Moreover, the BaxΔSer184 mutant fused to GFP exhibited a higher affinity for mitochondria. In order to determine if the C-terminus of Bax is a mitochondrial insertion sequence, cytosolic proteins were fused to this domain. It was showed that GFP fused to the last 21 amino acids of Bax (GFP-21) does not co-localize to the OMM even during apoptosis whereas the same construct with a Ser184 deletion (GFP-20) inserted into the OMM [23]. The central role of the conformation of Hα9 has been further underlined by substitution of Pro168

located in the loop preceding the Hα9 (**figure 2**). Data by Borner's group suggested that this residue was essential for the targeting of Bax to the mitochondria [25, 26]. However, we have recently observed that this Pro was more likely involved in the control of Bax membrane-integration by occluding the Hα5 and Hα6 "pore forming" domain [24, 28].

In addition to the conformational changes in the C-terminus, the control of Bax-addressing and insertion also involves the N-terminus. The implication of the N-terminal domain was suggested by experiments on epitope exposure after Bax activation. This region shows a differential affinity to N-terminal specific antibodies before and after Bax activation implying that this domain undergoes crucial changes during apoptosis. The 6A7 antibody does not recognize the soluble cytosolic form of Bax but interacts with the mitochondrial or oligomeric forms [22, 23]. Numerous studies have revealed that Bax deleted of 19 amino acids in its N-terminus (BaxΔART, Apoptosis Regulation of Targeting) constitutively inserts into the OMM [14, 15, 24, 29-31]. The role of the Pro residues located at position 8 and 13 within the ART might be crucial. Indeed, site-directed mutagenesis experiments have shown that Pro13 was decisive for the maintenance of the cytosolic Bax conformation and that a substitution for Val increased its apoptogenecity [32]. This substitution Pro13Val caused conformational changes in soluble Bax, a strong binding of Bax to mitochondria and an enhancement of its oligomerization. Similarly, the simultaneous replacement of both Pro residues by Gly stimulates Bax translocation to the OMM in *S. cerevisiae* [28].

The association of Bax with microsomal or mitochondrial membranes using a cell-free system showed that contrary to Bcl-2, Bax bound poorly to these organelles [29]. Deletion of the C-terminus of Bax (BaxΔC) or exchanging the C-terminus of Bax and Bcl-xL shows that, unlike that of Bxl-xL, the C-terminus of Bax is not an addressing/anchoring signal. Furthermore, the consequence of a deletion of the C-terminus was investigated in yeast strains that co-expressed truncated forms of Bax (i.e. BaxΔC) and Bcl-xL (i.e. Bcl-xLΔC) and showed that BaxΔC was as efficient as full-length Bax in promoting cytochrome c release [30]. Moreover, it was reported that a substitution of the C-terminus of Bax by that of Bcl-xL (BaxΔCxL) does not modify its sub-cellular localization and its association with mitochondria in human and rat cells or in *S. cerevisiae* but abrogated its pro-apoptotic properties [33]. Overall, these results suggest that the C-terminus of Bax plays an important role in apoptosis but not in the addressing/targeting to the

mitochondria. Moreover, Bax or BaxΔC over-expression in BdGBM (Bax-deficient Glioblastoma Multiforme) cells enhanced their sensitivity to apoptosis, which was enhanced by that of BaxΔART or the combined deletion of the 2 extremities (BaxΔARTΔC) [24]. Likewise, there is a natural variant of Bax α, Bax Ψ, which lacks the N-terminus that is constitutively localized to mitochondria and is a more powerful inducer of apoptosis than Bax α [34]. Taken together these results indicate that both the N- and the C-termini functionally interact to control the activity of Bax and thus constitute two distinct ART domains as shown in yeast model by Arokium *et al*. [28].

Pro-apoptotic activity assays and localization studies by confocal microscopy of several N-terminal mutants of Bax α and Bax Ψ and chimera constructs indicated that the Hα1 corresponding to amino acids 20-37, is implicated in Bax targeting to mitochondria. Deletion of Hα1 impairs the binding of Bax α to mitochondria whereas a fusion of the N-terminus of Bax α with the cytosolic protein RFP (Red Fluorescent Protein), results in the binding of the chimera proteins to mitochondria both in cell-free assays and *in vitro*. In addition, a fusion protein Hα1-RFP has a mitochondrial localization, whereas the RFP-Hα9 remained cytosolic. The Hα1-RFP construct associated with mitochondria but was sensitive to an alkali treatment, suggesting that Hα1 was not an anchoring domain but an addressing sequence. Furthermore, a Leu26Gly substitution within the Hα1 significantly decreased the acellular association of *in vitro* translated Bax α and Bax Ψ mutants with mitochondria and also affected their *in vivo* mitochondrial localization [34]. Mutations in the Hα1 also blocked the subsequent activation of the execution phase of apoptosis. Conversely, a deletion of the C-terminus does not appear to influence Bax α and Bax Ψ mitochondrial addressing. It can thus be concluded that the N-terminal domain determines the addressing of Bax to mitochondria, while the C-terminal domain is involved in the maintenance of the inactive form of Bax. The pro-apoptotic activity of Bax is thus regulated by the conformation of both extremities.

The third important domain in the process of Bax-translocation to the OMM is formed by the central amphipathic helices Hα5 and Hα6, which are the putative pore forming domain of Bax as shown by Nouraini *et al.* [35]. Bax seems to insert into the OMM following a model already described for bacterial toxins, with the hydrophilic surfaces of Hα5 and Hα6 facing each other and the hydrophobic sides facing the liquid phase [13, 36]. A recent study demonstrated the role

of Hα5 and Hα6 as a transmembrane domain of Bax [37]. All these data suggest that Hα9 might not be the only domain involved in the membrane insertion of Bax [see ref. 25 for an alternative view].

1.3. Regulation of Bax by phosphorylation

Both anti- and pro-apoptotic Bcl-2 family members may be controlled by phosphorylation [38-40]. Several studies have reported a MEK1 or Akt regulation of Bax activation in diverse cellular systems [41-44]. A recent study has indicated that Akt kinase directly prevented Bax translocation to mitochondria via a phosphorylation of Ser184 [45]. It was reported that Bax conformational changes were sensitive to glucose metabolism and that Akt could prevent Bax activation and apoptosis by promoting glycolysis through multiple post-transcriptional mechanisms [43]. This phosphorylation required the PI3 kinase/Akt-pathway activation and appeared to be mediated by Akt itself. Akt-dependent phosphorylation of Bax promoted its sequestration to the cytoplasm, as phosphorylated Bax could not be immunoprecipitated with the conformation-specific antibody 6A7, indicating that phosphorylation maintained Bax in an inactive form. This phosphorylated Bax was shown to hetero-dimerize with Mcl-1, Bcl-xL and A1 in the cytoplasm of neutrophils [45]. Another recent study reported that nicotine could inactivate the pro-apoptotic function of Bax also through phosphorylation of Ser184 [46]. In contrast, Linseman *et al*. [47] demonstrated that a phosphorylation of Ser163 stimulated apoptosis in neurons by promoting the translocation of Bax to the mitochondria.

Thus depending on the nature of the stimulus and/or site of phosphorylation (i.e. Ser163 or Ser184), Bax could be activated or inactivated. These results could have a very significant impact on the design of therapeutic strategies modulating apoptosis

1.4. How apoptotic signals trigger Bax mobilisation/activation ?

1.4.1. pH and temperature

It was reported that Bax activation and variations in the pH occurred in parallel during apoptosis [48, 49]. For example, staurosporine or TNFα treatment of HeLa cells was accompanied by intracellular pH variations and Bax activation [48]. Furthermore, it was shown that a low pH

promoted dimerization among Bcl-2 family proteins, suggesting that a conformational change occurred [50]. A recent study by our group showed that pH could induce a conformational change in Bax resulting in the N-terminal and BH3 domain being exposed leading to mitochondrial insertion and oligomerization [51]. Cell-free experiments have shown that in the pH range of 6.8 to 7.8, Bax bound poorly to mitochondria whereas at pH 8.2 or 6, Bax binding to mitochondria was significantly increased. Immunoprecipitation analyses have suggested that pH changes could induce two major alterations in the conformation of Bax. The first occurs at a pH between 6 and 6.8 or between 7.6 and 8, resulting in exposure of the BH3 domain. The second occurs at a pH <6 or >8, causing the N-terminus, which contains the addressing signal to be exposed [52]. These results suggest that high or low pH can induce a change in the conformation of Bax leading to its activation.

Several recent studies reported that heat could also induce Bax conformational changes and apoptosis [53-55]. It was shown that high temperatures (42-45°C) induced apoptosis whereas mild heat stress-induced thermotolerance in CHO and human adenocarcinoma cells [54]. Heat shock-induced apoptosis was associated with mitochondrial membrane potential decrease, Bax translocation to mitochondria, cytochrome c release and caspase 3 activation in normal cells whereas thermotolerant cells, that over-expressed heat shock proteins (Hsps) 27, 32, 70 and 90 were resistant. It was also reported that heat treatment of cells for 1 hour at 43°C resulted in Bax activation, as demonstrated by immunofluorescence analyses using a conformation specific anti-Bax antibody (6A7) [53]. These events are inhibited in cells over-expressing Hsp70. However, Hsp70 was unable to prevent cell death after mitochondrial disruption and subsequent caspase 3 activation, indicating that Hsp70 acted upstream of mitochondria by inhibiting events leading to Bax activation and thereby preventing the release of pro-apoptotic proteins from mitochondria. Of note, a recent study reported that Bax and Bak could be directly activated by heat [55]. Taken together, these results suggest that heat can induce conformational changes in Bax leading to its translocation to mitochondria.

1.4.2. BH3-only proteins

The BH3-only proteins (BOPs) have an essential role in the initiation of apoptosis in *C. elegans* [56], mice [57] and human cells [58]. A study of the phenotypes of transgenic mouse combined with genetic analyses support the idea that BOPs are specific sensors of different signals of

apoptosis and convey the apoptotic signal to the different multidomain pro-apoptotic proteins [57, 59-69]. For example, Bim and Bad are activated after cytokines deprivation [60-62], Noxa and Puma are activated after genomic DNA damage [63, 64], Bmf is activated by anoikis and UV-irradiation [65] and Bid is activated by the death receptor Fas [16, 66].

BOPs mediate the Bax-dependent cell death pathway by acting upstream as sensors of different apoptotic stimuli [67-69]. Recent studies with BH3 peptides have suggested that there are two subgroups in the BOPs, leading to the classification of BOPs as either death agonists or survival antagonists: the Bid-like proteins (Bid, Bim) that can directly activate Bax and Bak and the Bad-like proteins (Bad, Bik) that sensitize cells to apoptosis by inhibiting the Bcl-2/Bax interaction [70, 71].

Some BOPs activate apoptosis by inhibiting anti-apoptotic members of the Bcl-2 family by formation of mitochondrial hetero-dimers Bcl-2 (or Bcl-xL)/BOP, leading to the activation of Bax [57, 72]. NMR studies have shown a possible interaction of Bcl-2 and Bcl-xL with Bad *in vitro* [73] and several studies have shown a Bim/Bcl-2 and Bim/Bcl-xL interactions [61, 74].

On the other hand, some proteins of the BOP group, like Bid, were shown to directly interact with Bax [75]. However, although binding of BOPs to their anti-apoptotic relatives has been well-documented, the direct interaction of BOPs such as Bid or Bim with Bax has only recently been reported [32, 76, 77]. Bid could interact with the H□ 1 of Bax, leading to Bax activation as measured by the binding of the conformation-specific antibody 6A7 and the release of cytochrome c. Furthermore, a mutation in the Bid-BH3 domain, Arg84Gly, was found to abrogate these effects and this effect can be mirrored by a Asp33Ala mutation in the Hα1 of Bax [76]. Of note, the latter mutation has been found to disrupt the salt bridge formed between the Hα1 of Bax and BH3 domain suggesting that the Bid-BH3 domain could induce Bax conformational changes, at least partially, by disrupting this endogenous salt bridge by competition for the Hα1 of Bax [24].

1.4.3. Inhibitors and activators of Bax

To identify proteins that would selectively bind to Bax, numerous yeast two-hybrid screens were performed.

1.4.4. Humanin

Humanin (Hn), a 3 kDa peptide, was first identified as an anti-apoptotic peptide that inhibited presenilin-induced apoptosis in neuronal cells [78]. Hn was shown to impede the translocation of Bax from the cytosol to the mitochondria thereby protecting cells from apoptosis-inducing signals that target the mitochondrial but not the non-mitochondrial, cell death pathway [79]. Indeed, a knock-down in Hn expression augmented the sensitivity of cells to apoptosis by increasing the translocation of Bax to mitochondria. Surprisingly, there is a mitochondrial gene coding for the same peptide suggesting a possible gene transfer from the mitochondrial to the nuclear genome during evolution [79].

Two studies by Reed's group have shown that Hn was able to bind to the extra long isoform of Bim (BimEL) and Bid thereby abrogating their activation of Bax and Bak [80, 81]. *In vitro* protein-protein interaction assays, immunoprecipitation assays and fluorescence polarization assays have been used to demonstrate the binding of Hn to Bid. Moreover, Hn conserved a protective activity in *bax-/-* mitochondria, indicating that Hn could inhibit the tBid-induced release of apoptogenic factors from this organelle in a Bax-independent manner. In the same study, it was shown that the first 12 amino acids of Hn were necessary and sufficient to bind and suppress tBid activity *in vitro* and *in vivo*.

1.4.5. Ku70

Yeast two-hybrid screening allowed the identification of Ku70 as an inhibitor of Bax [82]. Ku70 is a ubiquitous protein present in the cytoplasm and nucleus and is a subunit of the Ku antigen implicated in the reparation of non-homologous double-stranded DNA. Independently, Ku70 appears to inhibit Bax. Ku70 deficient mice are extremely sensitive to anti-cancer drugs without having any effect on DNA repair and an increased concentration of Ku70 has been detected in

some cancers [83]. An over-expression of Ku70 inhibited the Bax-dependent signaling pathway whereas the suppression of Ku70 increased Bax-dependent apoptosis. This interaction of Ku70 and Bax occurs via the C-terminus of Ku70 and the N-terminus of Bax resulting in the cytosolic sequestration of Bax. Minimal peptides inhibiting Bax were designed from the C-terminal domain of Ku70 [84, 85].

1.4.6. 14-3-3 proteins

Some isoforms of the cytosolic and highly conserved protein 14-3-3 (θ, ε, ζ) seem to regulate Bax function. Numerous cellular processes (cell cycle, cell death, intracellular traffic) are under the control of these proteins, which sequestrate regulatory proteins by hetero-dimerization. The 14-3-3θ isoform can interact directly with Bax and sequestrate Bax in the cytosol [39]. This interaction requires both the N- and C-terminal domains of Bax but does not require its phosphorylation. The over-expression of 14-3-3θ decreases apoptosis induced by the over-expression of Bax in 293T cells or by an agonist of death receptors in HeLa cells. Conversely, during apoptosis, Bax is liberated from 14-3-3θ by caspase-dependent mechanisms and is translocated to the mitochondria.

1.4.7. Bif-1

By yeast two-hybrid using Bax as bait, a new interacting protein was identified and called Bif-1 (Bax interacting factor 1) [86, 87]. Bif-1, a member of the endophilin B protein family is a protein of 365 amino acids and its C-terminal domain (amino acids 308 to 364) contains a region with a high similarity to the SH3 domain (Src homology 3 domain) implicated in signal transduction pathways and cellular communication. Bif-1 mRNA is expressed in several tissues such as heart, skeletal muscle, kidneys and placenta [86]. There are controversial results about Bif-1 function and effect on Bax.

Heim's group showed that Bif-1 could interact with Bax via their N-terminal domains and co-localized with Bax in the cytosol. However, the over-expression of Bif-1 had no influence on Bax-dependent apoptosis in 293T and HeLa cells [87]. Wang's group suggested that Bif-1 was

partially co-localized with Bax and was involved in the activation of Bax-dependent pathways. The interaction of Bif-1 with Bax *via* the N-terminal domain induced a conformational change in Bax and its translocalization to mitochondria [86].

Bif-1 was also shown to play a regulatory role in apoptotic activation, not only of Bax, but also Bak [88]. Inhibition of the endogenous expression of Bif-1 by siRNA abrogated Bax conformational change, cytochrome c release and caspase 3 activation induced by various intrinsic death signals (adriamycin, staurosporine, actinomycin D, tunicamycin). Bif-1 was shown to interact with Bax on mitochondria but this association decreased 24 hours after tunicamycin treatment of MEFs, suggesting the formation of a transitory Bif-1/Bax complex in response to apoptotic stimuli. Furthermore, the suppression of Bif-1 expression had no effect on the cell death induced by BaxΔS184, a conformational changed and mitochondria-bound mutant, suggesting that Bif-1 was involved in Bax-mediated apoptosis by controlling its recruitment to mitochondria. Immunoprecipitation assays using an anti-Bak antibody that recognized only the conformational altered Bak protein showed that loss of Bif-1 prevented Bak activation induced by tunicamycin or staurosporine treatment. Moreover, suppression of Bif-1 expression was associated with an enhanced ability of HeLa cells to form colonies in soft agar and tumors in nude mice after implantation. These results suggest that Bif-1 may function as a tumor suppressor.

1.4.8. Clusterin

Clusterin, also named apolipoprotein J or TRPM-2 (testosterone-repressed prostate message 2), is a glycoprotein that has diverse functions, notably apoptosis regulation and is over-expressed in several human cancers such as prostate cancers, breast cancers and squamous cell carcinoma [89, 90]. There are two forms of clusterin: the cytoplasmic form of 60 kDa and the secreted form of 40 kDa, which is a hetero-dimer consisting of α and β chains. Unlike other inhibitors of Bax, clusterin specifically interacts with conformation-altered Bax in response to chemotherapeutic drugs, thus inhibiting the oligomerization of Bax [91]. Indeed, immunocytochemistry and cell fractionation experiments showed that clusterin was mainly mitochondrial. Transfection experiments showed that clusterin provided protection against apoptosis induced by etoposide or camptothecin. Moreover, the 6A7 antibody that specifically detects activated Bax co-immunoprecipitated clusterin in etoposide-treated cells. Cross-linking experiments showed that

this interaction inhibited Bax oligomerization. Moreover, mutation analyses showed that the α chain and not the β chain, of clusterin interacted with Bax. Given that clusterin is widely over-expressed in human cancers and induced by chemotherapeutic drugs, these results suggest that disrupting the clusterin-Bax interaction may be an attractive strategy for anti-cancer therapy.

1.5. Bax oligomerization, mitochondrial permeabilization and cytochrome c release

Activation of the pro-apoptotic proteins Bax and Bak lead to their oligomerization and the permeabilization of the OMM. Two models of permeabilization are proposed: the non-specific rupture of the OMM or the formation of specific channels in the OMM [92].

The first model implicates the rupture of the OMM after the swelling of the mitochondrial matrix. This model is based on different observations: the fall of $\Delta\psi m$ and cytochrome c release induced by the addition of Bax on isolated mitochondria are inhibited by the addition of cyclosporine A, bongkrekic acid and the calcium depletion, which inhibit the mitochondrial permeability Transition Pore (mPTP) [93-95]. The opening of this non-specific megachannel induces the fall of $\Delta\psi m$ and the swelling of the mitochondria that causes the rupture of the OMM and the massive release of cytochrome c. However, several studies show that swelling is not an absolute prerequisite during the *in vivo* apoptosis [93, 96] and cytochrome c release has been shown to occur in the absence of mitochondrial depolarization [97].

Bcl-2 family proteins have been proposed to be regulatory elements of the mPTP by interaction between Bax/ANT (adenosine nucleotide translocator) and Bax/VDAC (voltage dependent anionic channel) thanks to the BH3 domain [98, 99]. It was shown that only VDAC is essential for the apoptotic function of Bax [98, 100]. Bax, localized to mitochondria after apoptotic stimuli, directly interacts with VDAC thus leading to its opening and the release of cytochrome c whereas Bcl-xL interaction with VDAC leads to its closure. However, the diameter of VDAC is not enough large to permit cytochrome c passage. It was then suggested that Bax could induce a conformational change in the VDAC or, another possibility was that Bax and VDAC together formed a megachannel. On the flip side, Kroemer's group showed the importance of Bax/ANT interaction [99, 101]. Two-hybrid and co-immunoprecipitation experiments suggest that these two proteins can interact. Moreover, purified Bax and ANT are sufficient to induce liposome permeabilization after atractyloside-treatment. The oligomerization (homo-dimerization or

multimerization) of Bax seems to be needed to form channels. In this case, ANT regulates the insertion and the oligomerization of Bax in the OMM and cytochrome c release is dependent on the channel characteristics of Bax.

Other studies have shown that VDAC or ANT do not participate in mitochondrial clustering formed by Bax oligomerization [20, 102, 103]. An alternative model is based on intrinsic characteristics of Bcl-2 protein family. 3-D structural analyses of Bcl-xL revealed structural and functional similarities with the diphtheria toxin and the bacterial colicine, which can form channels [36]. Moreover this channel activity was shown in lipidic membranes [104]. Later, it was shown that Bax, tBid and Bcl-2 have similar structures and were able to form channels in lipidic membranes [105-108]. Channel formation by bacterial toxins has been described and is realized in three steps: association with membranes and orientation (with decrease in pH and negatively charged lipids). Then the amphipathic Hα5 and Hα6 are perpendicularly integrated into the lipidic bilayer and the neighboring helices are folded like an opened umbrella. Finally, the channel is formed by homo-dimerization or oligomerization of the bacterial toxin [107]. Similarly, Bcl-2 family proteins form channels with their central Hα5 and Hα6 at acidic non-physiologic pH. However, only Bax has a channel activity in liposomes at neutral pH and must undergo, like bacterial toxins, conformational changes in order to be translocated to OMM. Antonsson *et al*. [20] showed that Bax (BaxΔC) induced the release of a fluorescent probe from liposomes and at neutral pH this event could be inhibited by the addition of Bcl-2. Therefore, the channel characteristics of Bax are different from those of Bcl-2. Besides, destabilization of phospholipid membranes by Bax and especially by oligomers of Bax, in the presence of calcium [109], seems to generate channels with a diameter of 22 Å, which might be sufficient for cytochrome c release [110, 111]. The last model could explain how oligomers of Bax permeabilize the OMM and induce the release of apoptogenic factors from the intermembrane space to the cytosol. Although the existence of such channels has not been shown *in vivo*, patch-clamp experiments have suggested a correlation between the apparition of a new ionic channel on proteoliposomes made from OMM obtained from mammalian apoptotic cells or from Bax-expressing yeast [112]. This channel, named MAC (Mitochondrial Apoptosis-induced Channel) is linked to Bax on mitochondria, its activity is sensitive to the anti-apoptotic protein Bcl-2 and its largest conductance implies a diameter enough large ($\geq$4 nm) for the diffusion of cytochrome c and molecules with higher molecular weight. Alternatively, Bax and tBid can generate lipidic

channels enough large to permit the release of cytochrome c [110, 113]. It has been suggested that membrane permeabilization needs the cooperation between Bax, tBid and lipids, essentially cardiolipids, in order to permit Bax activity [102]. Models based on channel formation in the OMM allow for the conservation of integrity and functionality of the inner mitochondrial membrane [114].

2. Conclusion

Of the several hundreds of nuclear encoded proteins, which compose the mitochondrion, Bax is somewhat special, as it becomes mitochondrial only when a death sentence is passed on the cell. This feature might not be restricted only to Bax as an increasing number of proteins have been described to translocate to this organelle during the first stages of apoptosis and in due course, mitochondria take revenge by exporting intrinsic proteins to the cytosol. Bax appears to be the orchestraconductor of this lethal exchange together with Bak, a constitutive mitochondrial protein, with which Bax shares many but not all functions. Bax is a fascinating protein as it undergoes probably several distinct changes in conformations at the onset of apoptosis before becoming fully integrated into the OMM. As depicted in Fig. 3, several steps can be considered. First, the activation of Bax by various stimuli of different natures (proteins, lipids, pH, heat…), which causes a conformational change in Bax "en route" to the mitochondria; second, the interaction of Bax with putative receptors (lipids, proteins) in the OMM resulting in the association and presumable integration into mitochondria; third, the acquisition of a membrane embedded conformation, which is associated with the oligomerization of Bax and the release of mitochondrial proteins such as cytochrome c or AIF. Many questions remain open from this simplistic model. What are the partners of Bax during this journey? What kind of changes in conformation does Bax undergo, and where and when do they take place? The answers of these questions are of importance not only for the comprehension of apoptosis but may be also in other functions in which Bax could be implicated such as the mitochondrial fission or fusion. More importantly, they may be useful in the design of new therapeutic tools as apoptosis is involved in many pathologies (cancer, neurodegenerative diseases such as Parkinson, Huntington, Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis).

Acknowledgments

We thank our colleagues at the UMR 601 INSERM/Université de Nantes for fruitful discussions and apologize for all the important works not cited in this review due to a lack of space. Work in our lab is supported by a special grant from the Ligue National contre le cancer (Equipe labellisée) and the "Institut National de la Santé et la Recherche Médicale" (INSERM).

References

[1] G.I. Evan, K.H. Vousden, Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer, Nature 411 (2000) 342-348.

[2] J.M. Adams, S. Cory, Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family, Trends Biochem. Sci. 26 (2001) 61-66.

[3] Y. Akao, Y. Otsuki, S. Kataoka, Y. Ito, Y. Tsujimoto, Subcellular localization of bcl-2: detection in nuclear outer membrane, endoplasmic reticulum membrane, and mitochondrial membranes, Cancer Res. 54 (1994) 2468-2471.

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

[5] Z.N. Oltvai, C.L. Milliman, S.J. Korsmeyer, Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death, Cell 74 (1993) 609-619.

[6] E. Yang, J. Zha, J. Jockel, L.H. Boise, C.B. Thompson, S.J. Korsmeyer, Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death, Cell 80 (1995) 285-291.

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

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

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

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

[11] K.G. Wolter, Y.T. Hsu, C.L. Smith, A. Nechushtan, X.G. Xi, R.J. Youle, Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis, J. Cell Biol. 139 (1997) 1281-1292.

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

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

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

[15] P.F. Cartron, L. Oliver, S. Martin, C. Moreau, M.T. LeCabellec, P. Jezequel, K. Meflah, F.M. Vallette, The expression of a new variant of the pro-apoptotic molecule Bax, Baxpsi, is correlated with an increased survival of glioblastoma multiforme patients, Hum. Mol. Genet. 11 (2002) 675-687.

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

[17] E.L. Soucie, M.G. Annis, J. Sedivy, J. Filmus, B. Leber, D.W. Andrews, L.Z. Penn, Myc Potentiates Apoptosis by Stimulating Bax Activity at the Mitochondria, Mol. Cell. Biol. 21 (2001) 4725-4736

[18] P. Juin, A. Hunt, T. Littlewood, B. Griffiths, L.B. Swigart, S. Brown, S. Korsmeyer, G. Evan, c-Myc Functionally Cooperates with Bax To Induce Apoptosis, Mol. Cell. Biol. 22 (2002) 6158-6169

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

[20] B. Antonsson, S. Montessuit, B. Sanchez, J.C. Martinou, Bax is present as a high

molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells, J. Biol. Chem. 276 (2001) 11615-11623.

[21] G. Guihard, G. Bellot, C. Moreau, G. Pradal, N. Ferry, R. Thomy, P. Fichet, K. Meflah, F.M. Vallette, The Mitochondrial Apoptosis-induced Channel (MAC) Corresponds to a Late Apoptotic Event, J. Biol. Chem. 279 (2004) 46542-46550.

[22] A. Nechushtan, C.L. Smith, I. Lamensdorf, S.H. Yoon, R.J. Youle, Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis, J. Cell Biol. 153 (2001) 1265-1276.

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

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

[25] A. Schinzel, T. Kaufmann, C. Borner, Bcl-2 family members: integrators of survival and death signals in physiology and pathology, Biochim. Biophys. Acta 1644 (2004) 95-105.

[26] A. Schinzel, T. Kaufmann, M. Schuler, J. Martinalbo, D. Grubb, C. Borner, Conformational control of Bax localization and apoptotic activity by Pro168, J. Cell Biol. 164 (2004) 1021-32.

[27] M.G. Annis, E.L. Soucie, P.J. Dlugosz, J.A. Cruz-Aguado, L.Z. Penn, B. Leber, D.W. Andrews, Bax forms multispanning monomers that oligomerize to permeabilize membranes during apoptosis, EMBO J. 24 (2005) 2096–2103.

[28] H. Arokium, N. Camougrand, F.M. Vallette, S. Manon, Studies of the interaction of substituted mutants of BAX with yeast mitochondria reveal that the C-terminal hydrophobic alpha-helix is a second ART sequence and plays a role in the interaction with anti-apoptotic BCL-xL, J. Biol. Chem. 279 (2004) 52566-52573.

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

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

[31] M. Priault, P.F. Cartron, N. Camougrand, B. Antonsson, F.M. Vallette, S. Manon, Investigation of the role of the C-terminus of Bax and of tc-Bid on Bax interaction with yeast mitochondria, Cell Death Differ. 10 (2003) 1068-1077.

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

[33] L. Oliver, M. Priault, K. Tremblais, M.T. LeCabellec, K. Meflah, S. Manon, F.M. Vallette, 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 (2000) 161-165.

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

[35] S. Nouraini, E. Six, S. Matsuyama, S. Krajewski, J.C. Reed, The putative pore-forming domain of Bax regulates mitochondrial localization and interaction with Bcl-X(L), Mol. Cell. Biol. 20 (2000) 1604-1615.

[36] S.W. Muchmore, M. Sattler, H. Liang, R.P. Meadows, J.E. Harlan, H.S. Yoon, D. Nettesheim, B.S. Chang, C.B. Thompson, S.L. Wong, S.L. Ng, S.W. Fesik, X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death, Nature 381 (1996) 335-341.

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

[38] S.R. Datta, A. Brunet, M.E. Greenberg, Cellular survival: a play in three Akts, Genes Dev. 13 (1999) 2905-2927.

[39] M. Nomura, S. Shimizu, T. Sugiyama, M. Narita, T. Ito, H. Matsuda, Y. Tsujimoto, 14-3-3 Interacts directly with and negatively regulates pro-apoptotic Bax, J. Biol. Chem. 278 (2003) 2058-2065.

[40] C.D. Scatena, Z.A. Stewart, D. Mays, L.J. Tang, C.J. Keefer, S.D. Leach, J.A. Pietenpol, Mitotic phosphorylation of Bcl-2 during normal cell cycle progression and Taxol-induced growth arrest, J. Biol. Chem. 273 (1998) 30777-30784.

[41] H. Yamaguchi, H.G. Wang, The protein kinase PKB/Akt regulates cell survival and apoptosis by inhibiting Bax conformational change, Oncogene 20 (2001) 7779-7786.

[42] F. Tsuruta, N. Masuyama, Y. Gotoh, The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt pathway suppresses Bax translocation to mitochondria, J. Biol. Chem. 277 (2002) 14040-14047.

[43] J.C. Rathmell, C.J. Fox, D.R. Plas, P.S. Hammerman, R.M. Cinalli, C.B. Thompson, Akt-directed glucose metabolism can prevent Bax conformation change and promote growth factor-independent survival, Mol. Cell Biol. 23 (2003) 7315-7328.

[44] X.D. Zhang, J.M. Borrow, X.Y. Zhang, T. Nguyen, P. Hersey, Activation of ERK1/2 protects melanoma cells from TRAIL-induced apoptosis by inhibiting Smac/DIABLO release from mitochondria, Oncogene 22 (2003) 2869-2881.

[45] S.J. Gardai, D.A. Hildeman, S.K. Frankel, B.B. Whitlock, S.C. Frasch, N. Borregaard, P. Marrack, D.L. Bratton, P.M. Henson, Phosphorylation of Bax Ser184 by Akt regulates its activity and apoptosis in neutrophils, J. Biol. Chem. 279 (2004) 21085-21095.

[46] M. Xin, X. Deng, Nicotine inactivation of the proapoptotic function of Bax through phosphorylation, J. Biol. Chem. 280 (2005) 10781-10789.

[47] D.A. Linseman, B.D. Butts, T.A. Precht, R.A. Phelps, S.S. Le, T.A. Laessig, R.J. Bouchard, M.L. Florez-McClure, K.A. Heidenreich, Glycogen synthase kinase-3β phosphorylates Bax and promotes its mitochondrial localization during neuronal apoptosis, J. Neurosci. 24 (2004) 9993-10002.

[48] M. Tafani, J.A. Cohn, N.O. Karpinich, R.J. Rothman, M.A. Russo, J.L. Farber, Regulation of intracellular pH mediates Bax activation in HeLa cells treated with staurosporine or tumor necrosis factor-alpha, J. Biol. Chem. 277 (2002) 49569-49576.

[49] A.R. Khaled, K. Kim, R. Hofmeister, K. Muegge, S.K. Durum, Withdrawal of IL-7 induces Bax translocation from cytosol to mitochondria through a rise in intracellular pH, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96 (1999) 14476-14481.

[50] Z. Xie, S. Schendel, S. Matsuyama, J.C. Reed, Acidic pH promotes dimerization of Bcl-2 family proteins, Biochemistry 37 (1998) 6410-6418.

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

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

[53] A.R. Stankiewicz, G. Lachapelle, C.P. Foo, S.M. Radicioni, D.D. Mosser, Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation, J. Biol. Chem. 280 (2005) 38729-38739.

[54] A. Bettaieb, D.A. Averill-Bates, Induced at a mild temperature of 40 degrees C protects cells against heat shock-induced apoptosis, J. Cell Physiol. 205 (2005) 47-57.

[55] L.J. Pagliari, T. Kuwana, C. Bonzon, D.D. Newmeyer, S. Tu, H.M. Beere, D.R. Green, The multidomain proapoptotic molecules Bax and Bak are directly activated by heat, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102 (2005) 17975-17980.

[56] B. Conradt, H.R. Horvitz, The C. elegans protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9, Cell 93 (1998) 519-529.

[57] P. Bouillet, A. Strasser, BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death, J. Cell Sci. 115 (2002) 1567-1574.

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

[59] X.M. Yin, K. Wang, A. Gross, Y. Zhao, S. Zinkel, B. Klocke, K.A. Roth, S.J. Korsmeyer, Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis, Nature 400 (1999) 886-891.

[60] P. Bouillet, D. Metcalf, D.C. Huang, D.M. Tarlinton, T.W. Kay, F. Kontgen, J.M. Adams, A. Strasser, Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity, Science 286 (1999) 1735-1738.

[61] H. Puthalakath, D.C. Huang, L.A. O'Reilly, S.M. King, A. Strasser, The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex, Mol. Cell 3 (1999) 287-296.

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

[63] K. Nakano, M. Matsumura, Improvement of treatment efficiency of thermophilic oxic process for highly concentrated lipid wastes by nutrient supplementation, J. Biosci. Bioeng. 92 (2001) 532-538.

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

[65] H. Puthalakath, A. Villunger, L.A. O'Reilly, J.G. Beaumont, L. Coultas, R.E. Cheney, D.C. Huang, A. Strasser, Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis, Science 293 (2001) 1829-1832.

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

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

[68] W.X. Zong, T. Lindsten, A.J. Ross, G.R. MacGregor, C.B. Thompson, BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak, Genes Dev. 15 (2001) 1481-1486.

[69] C.A. Harris, E.M. Jr Johnson, BH3-only Bcl-2 family members are coordinately regulated by the JNK pathway and require Bax to induce apoptosis in neurons J. Biol. Chem. 276 (2001) 37754-37760.

[70] A. Letai, M.C. Bassik, L.D. Walensky, M.D. Sorcinelli, S. Weiler, S.J. Korsmeyer, Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics, Cancer Cell 2 (2002) 183-92.

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

[72] C. Borner, Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions, Mol. Immunol. 39 (2003) 615-647.

[73] A.M. Petros, S.W. Fesik, E.T. Olejniczak, 1H, 13C and 15N resonance assignments of a Bcl-xL/Bad peptide complex, J. Biomol. NMR. 32 (2005) 260.

[74] A. Strasser, H. Puthalakath, P. Bouillet, D.C. Huang, L. O'Connor, L.A. O'Reilly, L. Cullen, S. Cory, J.M. Adams, The role of bim, a proapoptotic BH3-only member of the Bcl-2 family in cell-death control, Ann. N. Y. Acad. Sci. 917 (2000) 541-548.

[75] R. Eskes, S. Desagher, B. Antonsson, J.C. Martinou, Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane, Mol. Cell Biol. 20 (2000) 929-935.

[76] P.F. Cartron, T. Gallenne , G. Bougras, F. Gautier, F. Manero, P. Vusio, K. Meflah, F.M. Vallette, P. Juin, 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 (2004) 807-818.

[77] H. Harada, B. Quearry, A. Ruiz-Vela, S.J. Korsmeyer, Survival factor-induced extracellular signal-regulated kinase phosphorylates BIM, inhibiting its association with BAX and proapoptotic activity, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101 (2004) 15313-15317.

[78] Y. Hashimoto, T. Niikura, Y. Ito, H. Sudo, M. Hata, E. Arakawa, Y. Abe, Y. Kita, I. Nishimoto, Detailed characterization of neuroprotection by a rescue factor humanin against various Alzheimer's disease-relevant insults, J. Neurosci. 21 (2001) 9235-9245.

[79] B. Guo, D. Zhai, E. Cabezas, K. Welsh, S. Nouraini, A.C. Satterthwait, J.C. Reed, Humanin peptide suppresses apoptosis by interfering with Bax activation, Nature 423 (2003) 456-461.

[80] F. Luciano, D. Zhai, X. Zhu, B. Bailly-Maitre, J.E. Ricci, A.C. Satterthwait, J.C. Reed, Cytoprotective peptide humanin binds and inhibits proapoptotic Bcl-2/Bax family protein BimEL, J . Biol. Chem. 280 (2005) 15825-15835.

[81] D. Zhai, F. Luciano, X. Zhu, B. Guo, A.C. Satterthwait, J.C. Reed, Humanin binds and nullifies Bid activity by blocking its activation of Bax and Bak, J. Biol. Chem. 280 (2005) 15815-15824.

[82] M. Sawada, W. Sun, P. Hayes, K. Leskov, D.A. Boothman, S. Matsuyama, Ku70 suppresses the apoptotic translocation of Bax to mitochondria, Nat. Cell Biol. 5 (2003) 320-329.

[83] S.H. Kim, D. Kim, J.S. Han, C.S. Jeong, B.S. Chung, C.D. Kang, G.C. Li, Ku autoantigen affects the susceptibility to anticancer drugs, Cancer Res. 59 (1999) 4012-4017.

[84] M. Sawada, P. Hayes, S. Matsuyama, Cytoprotective membrane-permeable peptides designed from the Bax-binding domain of Ku70, Nat. Cell Biol. 5 (2003) 352-357.

[85] T. Yoshida, I. Tomioka, T. Nagahara, T. Holyst, M. Sawada, P. Hayes, V. Gama, M. Okuno, Y. Chen, Y. Abe, T. Kanouchi, H. Sasada, D. Wang, T. Yokota, E. Sato, S. Matsuyama, Bax-inhibiting peptide derived from mouse and rat Ku70, Biochem. Biophys. Res. Commun. 321 (2004) 961-966.

[86] S.M. Cuddeback, H. Yamaguchi, K. Komatsu, T. Miyashita, M. Yamada, C. Wu, S. Singh, H.G. Wang, Molecular cloning and characterization of Bif-1. A novel Src homology 3 domain-containing protein that associates with Bax, J. Biol. Chem. 276 (2001) 20559-20565.

[87] B. Pierrat, M. Simonen, M. Cueto, J. Mestan, P. Ferrigno, J. Heim, SH3GLB, a new endophilin-related protein family featuring an SH3 domain, Genomics 71 (2001) 222-234.

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

[89] M. Gleave, B. Jansen, Clusterin and IGFBPs as antisense targets in prostate cancer, Ann. N. Y. Acad. Sci. (2003) 95-104.

[90] I.P. Trougakos, E.S. Gonos, Clusterin/apolipoprotein J in human aging and cancer, Int. J. Biochem. Cell. Biol. 34 (2002) 1430-1448.

[91] H. Zhang, J.K. Kim, C.A. Edwards, Z. Xu, R. Taichman, C.Y. Wang, Clusterin inhibits apoptosis by interacting with activated Bax, Nat. Cell. Biol. 7 (2005) 909-915.

[92] M.L. Lim, M.G. Lum, T.M. Hansen, X. Roucou, P. Nagley, On the release of cytochrome c from mitochondria during cell death signaling, J. Biomed. Sci. 9 (2002) 488-506.

[93] J.M. Jurgensmeier, Z. Xie, Q. Deveraux, L. Ellerby, D. Bredesen, J.C. Reed, Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95 (1998) 4997-5002.

[94] M. Narita, S. Shimizu, T. Ito, T. Chittenden, R.J. Lutz, H. Matsuda, Y. Tsujimoto, Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95 (1998) 14681-14686.

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

[96] F. De Giorgi, L. Lartigue, M.K. Bauer, A. Schubert, S. Grimm, G.T. Hanson, S.J. Remington, R.J. Youle, F. Ichas, The permeability transition pore signals apoptosis by directing Bax translocation and multimerization, FASEB J. 16 (2002) 607-609.

[97] E. Bossy-Wetzel, D.D. Newmeyer, D.R. Green, Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization, EMBO J. 17 (1998) 37-49.

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

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

[100] Y. Tsujimoto, S. Shimizu, The voltage-dependent anion channel: an essential player in apoptosis, Biochimie 84 (2002) 187-193.

[101] A.S. Belzacq, H.L. Vieira, G. Kroemer, C. Brenner, Adenine nucleotide translocator in apoptosis, Biochimie 84 (2002) 167-176

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

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

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

[105] S.L. Schendel, R. Azimov, K. Pawlowski, A. Godzik, B.L. Kagan, J.C. Reed, Ion channel activity of the BH3 only Bcl-2 family member, BID, J. Biol. Chem. 274 (1999) 21932-21936.

[106] S.L. Schendel, M. Montal, J.C. Reed, Bcl-2 family proteins as ion-channels, Cell Death Differ. 5 (1998) 372-380.

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

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

[109] R.F. Epand, J.C. Martinou, S. Montessuit, R.M. Epand, C.M. Yip, Direct evidence for membrane pore formation by the apoptotic protein Bax, Biochem. Biophys. Res. Commun. 298 (2002) 744-749.

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

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

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

[113] G. Kudla, S. Montessuit, R. Eskes, C. Berrier, J.C. Martinou, A. Ghazi, B. Antonsson, The destabilization of lipid membranes induced by the C-terminal fragment of caspase 8-cleaved bid is inhibited by the N-terminal fragment, J. Biol. Chem. 275 (2000) 22713-22718.

[114] O. von Ahsen, C. Renken, G. Perkins, R.M. Kluck, E. Bossy-Wetzel, D.D. Newmeyer, Preservation of mitochondrial structure and function after Bid- or Bax-mediated cytochrome c release, J. Cell Biol. 150 (2000) 1027-1036.

LEGENDS

Figure 1: Representation of all the known mammalian Bcl-2 family members. Bcl-2 homology regions 1-4 (BH1-4) are indicated. TM indicates a putative transmembrane region that mediates localization to intracellular membranes. α: Hα. The Hα5-Hα6 overlapping region containing the BH1 domain corresponds to the pore-forming region based on structural homology with bacterial toxins. The BH3 domain in the pro-apoptotic members is a ligand for the hydrophobic pocket formed by the BH1-BH3 domains of the anti-apoptotic members.

Figure 2: **Crucial amino acids and domains involved in Bax functions and/or mitochondrial targeting.**

Bcl-2 homology regions are indicated based on their structural homology with Bcl-2. C-term indicates the terminal alpha helix which has been suggested to be the transmembrane/addressing signal (see ref 25). The amino acid sequences of the alpha helices Hα1, Hα5, Hα6, Hα9 are represented in the single letter code. Crucial amino acids involved in Bax translocation and/or activation are labeled in red.

Figure 3: Schematic representation of Bax activation and mitochondrial integration during apoptosis.

Step 1: The conformation of ART is blocked in a conformation (with the participation of cytosolic proteins such as Ku70) that does not allow the exposition of Hα1. The latter helix is in close contact with BH3/Hα2, while Hα9 occludes from the Hα5-Hα6 pocket.

Steps 2: The movement of ART around the flexible zone between Pro8 and Pro13 allows the exposition of Hα1, which can interact with putative mitochondrial receptor(s) that may be of different natures (proteins, lipids) while the Hα5-Hα6, which is liberated from its interaction with Hα9 and triggers the integration of Bax into the membrane.

Steps 3: Hα5-Hα6 and Hα9 are inserted in the OMM. Both Hα2 (BH3) and Hα9 might participate in the oligomerization process. The insertion of Bax into mitochondria is associated with the liberation of apoptogenic proteins from the inner compartment of the organelle.

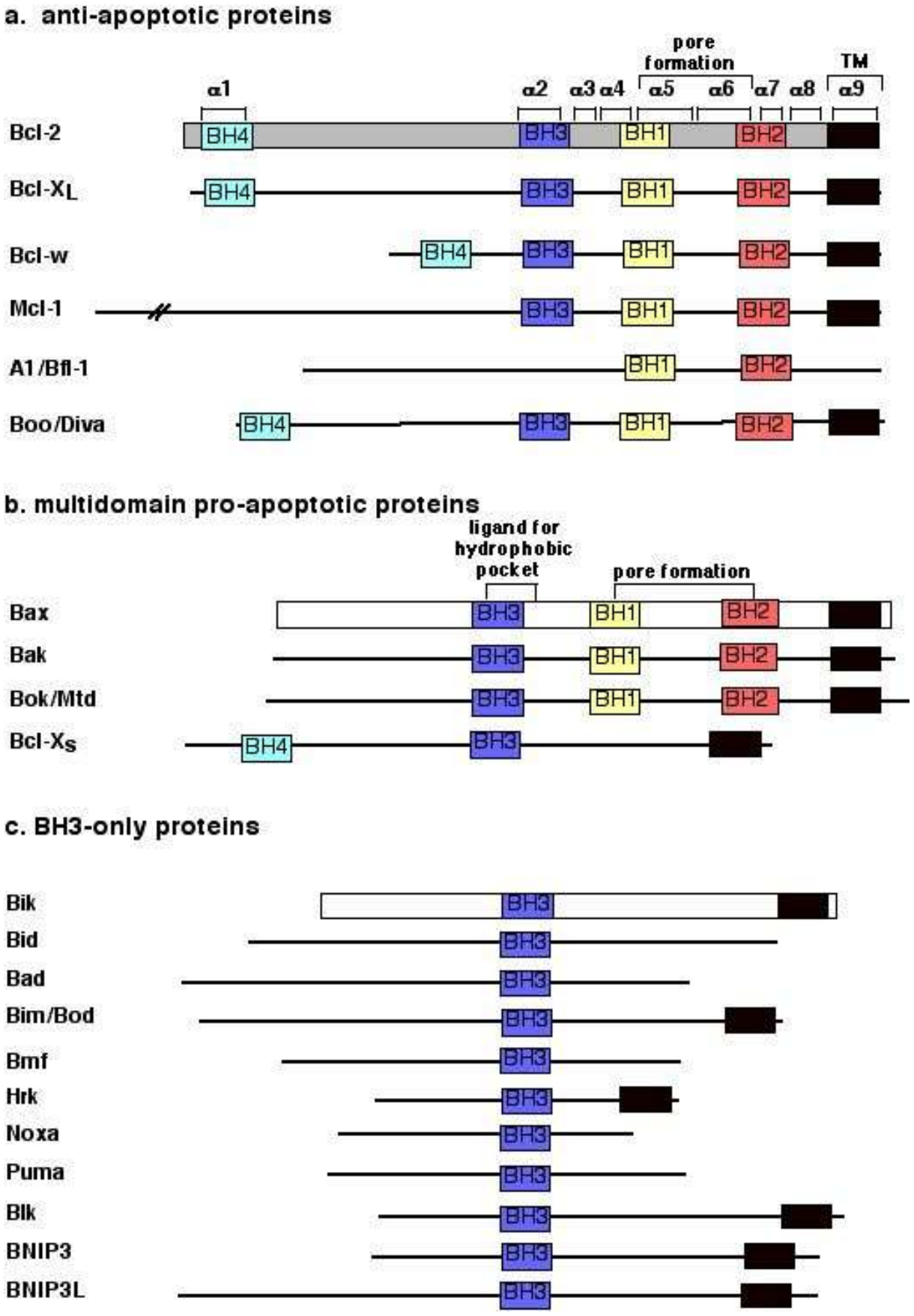

a. anti-apoptotic proteins
pore formation
TM
α1
α2
α3 α4
α5
α6
α7
α8
α9
Bcl-2
Bcl-XL
Bcl-w
Mcl-1
A1/Bfl-1
Boo/Diva
BH4
BH3
BH1
BH2
b. multidomain pro-apoptotic proteins
ligand for hydrophobic pocket
pore formation
Bax
Bak
Bok/Mtd
Bcl-XS
c. BH3-only proteins
Bik
Bid
Bad
Bim/Bod
Bmf
Hrk
Noxa
Puma
Blk
BNIP3
BNIP3L

Figure 1

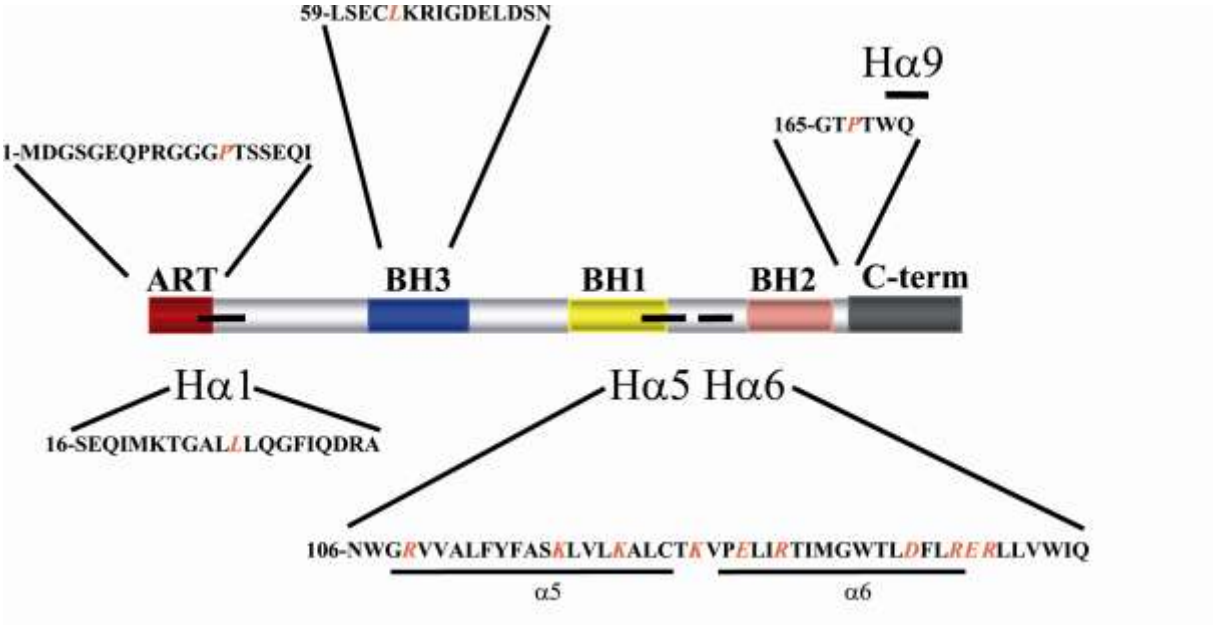

59-LSECLKRIGDELDSN
Hα9
165-GTPTWQ
1-MDGSGEQPRGGGPTSSEQI
ART
BH3
BH1
BH2
C-term
Hα1
Hα5 Hα6
16-SEQIMKTGALLLQGFIQDRA
106-NWGRVVALFYFASKLVLKALCTKVPELIRTIMGWTLDFLRERLLVWIQ
α5
α6

Figure 2

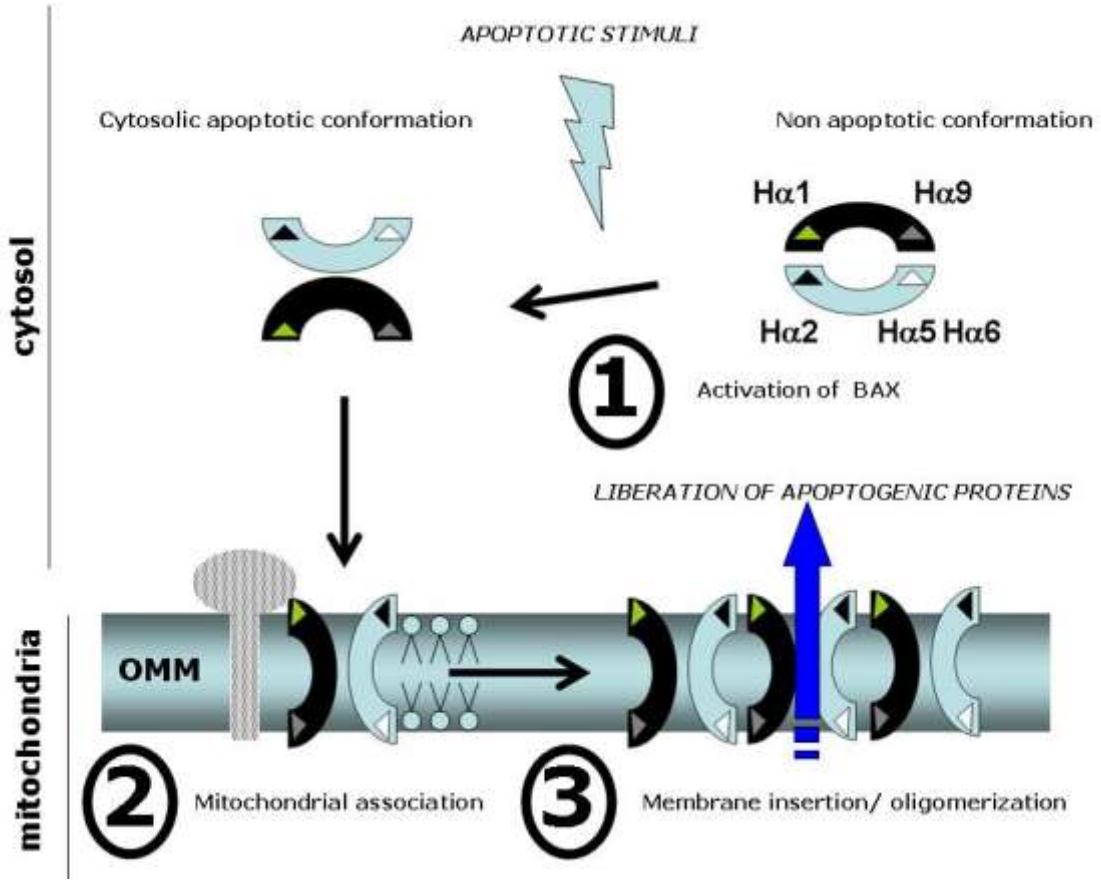

APOPTOTIC STIMULI
Cytosolic apoptotic conformation
Non apoptotic conformation
Hα1
Hα9
Hα2
Hα5 Hα6
cytosol
1
Activation of BAX
LIBERATION OF APOPTOGENIC PROTEINS
mitochondria
OMM
2
Mitochondrial association
3
Membrane insertion/ oligomerization

Figure 3

III. PHYSIOPATHOLOGIE.

1. Les maladies comme conséquence de dérégulations de l'apoptose.

Dans le corps humain adulte, plusieurs centaines de cellules sont produites chaque seconde par mitose, alors que simultanément un nombre similaire de cellules meurt par apoptose afin de maintenir l'homéostasie cellulaire (Fadeel *et al.,* 1999c). La dérégulation de l'apoptose peut jouer un rôle primaire ou secondaire dans de nombreuses maladies (Reed, 2002 ; Sorenson, 2004 ; Droin et Green, 2004). Ainsi, une apoptose insuffisante peut conduire à des cancers (accumulation de cellules, résistance aux thérapies, surveillance défective de la tumeur par le système immunitaire), des maladies auto-immunes (défaut d'élimination des lymphocytes auto-réactifs), des infections persistantes (défaut d'élimination des cellules infectées), alors qu'une apoptose excessive contribue à des maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson, Huntington, sclérose amyotrophique latérale), des maladies auto-immunes (induction de l'apoptose non contrôlée dans des organes spécifiques), le SIDA (déplétion des lymphocytes T), des pathologies rénales, et des ischémies (accident vasculaire cérébral, infarctus du myocarde). Le mauvais fonctionnement de la machinerie de mort cellulaire résulte le plus souvent de mutations de gènes qui codent pour des facteurs impliqués directement ou indirectement dans l'initiation, la médiation ou l'exécution de l'apoptose, et de nombreux de gènes apoptotiques mutés ont été identifiés comme étant la cause ou comme contribuant à certaines maladies humaines (Müllauer *et al.,* 2001).

2. Implication des membres de la famille Bcl-2 dans les cancers.

L'étude de l'apoptose est d'un vif intérêt puisque sa dérégulation est impliquée dans la formation et la progression tumorale, les métastases ainsi que la survenue de résistances multiples aux drogues (MDR, multi-drug resistance) au cours des thérapies anti-cancéreuses (Johnstone *et al.,*

2002). Des défauts au sein des voies de signalisation apoptotique contribuent en effet à augmenter les chances de survie et de développement des tumeurs en leur laissant le temps d'accumuler des altérations génétiques qui dérégulent la prolifération cellulaire, interfèrent avec la différentiation, promeuvent l'angiogenèse, et augmentent la mobilité et les propriétés invasives des cellules transformées (Reed, 1999). Ces défauts peuvent affecter l'expression ou l'activité de protéines intervenant à tout niveau dans la signalisation apoptotique et ayant aussi bien des fonctions pro-apoptotiques (Bax, Bcl-10, caspase 10, Fas, FasL, TNFR1, p53…) qu'anti-apoptotiques (Bcl-2, cIAP2, NAIP…) (Müllauer *et al.,* 2001). Les cellules tumorales sont aussi capables de résister au système immunitaire étant donné que leur destruction par les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules NK (natural killer) dépend de l'intégrité de la machinerie apoptotique (Tschopp *et al.,* 1999). Au cours de ces dernières années, il est devenu évident que la tumorigenèse est non seulement le résultat d'une prolifération excessive due à l'activation d'oncogènes, mais aussi dépend de l'altération des points de contrôle de l'apoptose (Hanahan et Weinberg, 2000 ; Wang XW, 1999). Curieusement, la plupart des modifications qui induisent la transformation maligne, comme la prolifération anormale et l'invasion cellulaire suite à l'activation d'un oncogène, sensibilise également une cellule à l'apoptose. C'est pourquoi seules les cellules oncogéniques transformées survivent et deviennent malignes et comme elles cumulent des défauts dans la voie apoptotique, elles sont protégées contre toute induction de mort cellulaire (Vousden et Lu, 2002). Une cellule transformée peut mettre en place des mécanismes de protection contre l'apoptose par activation ou expression de protéines anti-apoptotiques (qui fonctionnent comme des oncoprotéines) ou par l'inactivation de facteurs pro-apoptotiques (qui fonctionnent comme suppresseurs de tumeurs). Ainsi, l'action de certains traitements anticancéreux peut s'avérer inefficace, ou plus exactement être sujet à des phénomènes de résistance, élevant le seuil de sensibilité de l'apoptose et nécessitant l'utilisation de doses médicamenteuses plus fortes (Makin *et al.,* 2000). C'est pourquoi, la mise au point de drogues cytotoxiques capable de cibler et activer la signalisation apoptotique représente actuellement une stratégie thérapeutique anti-cancéreuse attrayante.

La dérégulation de l'expression des membres de la famille Bcl-2 est étroitement liée à la survenue de tumeurs (Strasser *et al.,* 1997). Certains types de tumeurs présentent une variation du nombre de copies de gènes anti-apoptotiques ou pro-apoptotiques (pour revue, Kirkin *et al.,* 2004). La progression tumorale résulte souvent de l'accumulation de mutations activatrices ou inhibitrices de gènes impliqués dans la prolifération et/ou la mort cellulaire (Duval et Hamelin,

2002). D'autres mutations affectant des protéines impliquées dans diverses voies de signalisation influencent indirectement les niveaux d'expression des régulateurs de l'apoptose. C'est le cas par exemple de la protéine p53 qui, en condition normale, active l'expression de la protéine Bax, et par conséquent, l'inactivation de p53 engendre une diminution de l'expression de Bax.

La sur-expression de Bcl-2 est commune à la plupart des types de cancers humains (pour revue, Kirkin *et al.,* 2004). Cette dérégulation de l'expression de la protéine de survie contribue à augmenter la résistance des cellules cancéreuses à la chimiothérapie (cf § **III – 3.**).

Le gène *bcl-2* a été caractérisé en tant qu'oncogène pour la première fois suite à la découverte de la translocation t(14 ;18), associée au lymphome folliculaire à cellules B, qui conduit à l'activation transcriptionnelle de ce gène. Par la suite, des études réalisées dans des cellules de moëlle osseuse de souris ont montré que la seule surexpression de *bcl-2* ne suffisait pas pour induire la tumorigenèse. Il semblerait en effet qu'une forte expression de cette protéine dans des cellules puisse assurer leur survie jusqu'à ce que d'autres mutations se produisent. En outre, dans de nombreux cas de tumeurs humaines, la seule translocation du gène *bcl-2* n'est pas corrélée au développement de tumeurs malignes. De surcroît, une translocation chromosomique t(14 ;18) a été détectée par PCR chez des individus ne présentant aucune pathologie (Limpens *et al.,* 1991 et 1995). Ces observations entérinent l'hypothèse qu'un ensemble de mutations oncogéniques additionnel est nécessaire au développement de lymphômes de type B. Ces mutations oncogéniques affectent des gènes candidats, notamment *p53, p73, myc, PTEN, MDM2* (Viardot *et al.,* 2003).

Plusieurs autres membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 sont surexprimés dans des tumeurs.

La surexpression de Bcl-xL promeut la transformation de cellules pancréatiques β induite par l'antigène SV40 large T (Naik *et al.,* 1996). Dans un autre modèle, le transgène *bcl-xL* accélère la conversion maligne de dermopapillomas induit par des agents chimiques (Pena *et al.,* 1998).

Bcl-w est plus particulièrement exprimée dans les cellules lymphoïdes, myéloïdes et des cellules d'origine épithéliales (O'Reilly *et al.,* 2001).

Mcl-1 est exprimée dans des monocytes « précocement » différenciés et promeut la survie de cellules myéloïdes immatures (Kozopas *et al.,* 1993).

De nombreuses données expérimentales montrent que l'absence de Bax ou un défaut de son activité constitue un facteur proto-oncogène strict et pertinent en clinique.

Des mutations dans le gène *bax* (mutations ponctuelles, décalages de cadre de lecture par insertion ou délétion) peuvent expliquer la survenue ou l'évolution de certaines tumeurs.

Notamment, 50 % des carcinomes du colon associés à un phénotype d'instabilité microsatellitaire (Microsatellite Mutator Phenotype ou MMP) (Müllauer *et al.,* 2001) présentent des mutations dans le gène *bax*. Les carcinomes du colon MMP (+) présentent des défauts dans la famille des gènes MMR (MisMatch Repair) impliqués dans la réparation des mésappariements (délétions ou insertions) de l'ADN, générés au cours de la réplication. Ces mésappariements affectent plus particulièrement des régions codantes ou non codantes appelées microsatellites, qui sont de courtes séquences nucléotidiques répétées. L'analyse génétique de ces carcinomes montre que le gène *bax* présente un décalage de cadre de lecture relatif à l'insertion ou à la délétion d'une désoxyguanosine, générant un codon stop prématuré, ce qui aboutit à la disparition de la protéine Bax du milieu intracellulaire. De plus, Ionov et coll. (2000) ont montré que l'inactivation de Bax confère un avantage clonal sélectif pour la survie et la progression de la tumeur. Enfin, ces carcinomes ne sont jamais associés à des mutations de p53 et semblent montrer que les mutations dans le gène *bax* suppriment la pression de sélection de mutations dans le gène *p53* pendant la tumorigenèse du colon. Ce résultat confirme le fait que les effets pro-apoptotiques de p53 passent par la mise en jeu de Bax (Rampino *et al.,* 1997).

Des mutations du gène *bax* sont aussi retrouvées dans 21 % des lignées tumorales hématopoïétiques (Meijerink *et al.,* 1998). Ce sont soit des décalages de cadre de lecture aboutissant à la disparition de la protéine du milieu intracellulaire, soit des mutations ponctuelles de type G11E, G67R ou G108V touchant respectivement les domaines N-terminal, BH3 et BH1 et compromettant les propriétés de dimérisation de la protéine. En effet, la protéine HA-BaxG67R, qui s'homodimérise avec le Bax endogène et fortement avec elle-même, ne se lie plus

à Bcl-2, et la protéine HA-BaxG108V, qui se lie aussi bien avec le Bax sauvage que Bcl-2, ne s'homodimérise pas. Bien que présentant des caractéristiques distinctes, les deux protéines ne sont plus capables de sensibiliser les cellules à une déprivation en IL-3 (Meijerink *et al.,* 1998).

Les mutations dans le gène *bax* concernent également les lignées lymphocytaires B de Hodgkin résistantes à la staurosporine (Kashkar *et al.,* 2002). La résistance des lymphômes de Hodgkin à la staurosporine (inhibiteur de la pKC) résulte d'un défaut d'activation de Bax. Dans ce cas, les cellules B de Hodgkin expriment normalement la protéine Bax ainsi que d'autres membres de la famille Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL et Bak), mais sous stimulation apoptotique induite par la staurosporine Bax ne s'active pas. L'origine moléculaire de ce défaut n'est pas connue (Kashkar *et al.,* 2002).

Des défauts de l'activité de Bax peuvent aussi contribuer à l'évolution de certaines tumeurs.

Une étude suggère notamment l'existence d'une relation entre le taux de dégradation de Bax par le système ubiquitine-protéasome et l'évolution de la gravité de carcinomes de la prostate chez l'homme (Li et Dou, 2000). Il est montré en effet que l'augmentation de la dégradation de Bax par le système ubiquitine-protéasome corrèle avec une diminution de la protéine au niveau intracellulaire et évolue parallèlement à la gravité, aux chances de survie et à la progression du cancer. Ainsi, cette voie de dégradation constitue une nouvelle cible thérapeutique potentielle pour les cancers de la prostate, notamment pour ceux surexprimant Bcl-2 (Li et Dou, 2000).

Une autre étude visant à identifier des marqueurs putatifs du cancer de la prostate a mis en évidence la surexpression de BI-1 (Bax Inhibitor 1), protéine capable de bloquer la mort cellulaire induite par une surexpression de Bax chez la levure et les cellules de mammifères (Xu et Reed, 1998), dans les cellules épithéliales de la plupart de ces cancers (Grzmil *et al.,* 2003). En outre, il est montré que l'inhibition de l'expression de BI-1 par ARN interférence augmente significativement l'apoptose spontanée de cellules issues de carcinomes de la prostate. L'ensemble de ces données suggèrent que BI-1 constitue une nouvelle cible potentielle dans la thérapie de cancers de la prostate (Grzmil *et al.,* 2003).

3. Implication des membres de la famille Bcl-2 dans la chimio- et la radiorésistance.

L'apoptose est le processus par lequel agissent la radiothérapie ainsi que de nombreuses drogues de chimiothérapie. Cependant, l'action de certains traitements anticancéreux peut s'avérer inefficace, ou plus exactement être sujet à des phénomènes de résistance. En effet, une expression altérée ou des gènes mutés codant pour des protéines clés de l'apoptose peuvent accroître le potentiel de survie de cellules cancéreuses et conférer ainsi une résistance aux drogues de chimiothérapie (Johnstone *et al.,* 2002). Dans ce contexte, la surexpression des membres anti-apoptotiques et la diminution d'expression des membres pro-apoptotiques dans certaines tumeurs ont été associées à leur aptitude à diminuer la sensibilité aux chimiothérapies (Panarekatis *et al.,* 2002 ; Buchholz *et al.,* 2003 ; Marriott *et al.,* 2003 ; Mounier *et al.,* 2003 ; Wei *et al.,* 2001 ; Zhang L *et al.,* 2000) et à accroître la radiorésistance (Condon *et al.,* 2002 ; Gilbert *et al.,* 1996 ; Lee *et al.,* 1999 ; Kariya *et al.,* 1999).

Theodorakis et coll. (2002) ont montré que les cellules HCT116 déficientes en protéine Bax étaient résistantes à l'apoptose induite par la staurosporine. De même, Zhang L. et coll. (2000) ont montré que la perte de Bax dans les cellules de carcinomes du colon résultait en une augmentation de résistance au 5-FU (5-Fluorouracile). Krajewski et coll. (1995) ont également montré que la diminution d'expression de Bax était associée à de mauvaises réponses aux chimiothérapies dans des adénocarcinomes métastasiques du sein.

Depuis le début des années 90, une relation causale entre la sur-expression des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et la chimiorésistance a été établie. Des études ont montré, en effet, que des protéines anti-apoptotiques empêchaient l'apoptose induite par des drogues de chimiothérapie comme les agents alkylants et les inhibiteurs de la topoisomérase (Kamesaki *et al.,* 1993 ; Watson *et al.,* 1993). De plus, chez des patients présentant un lymphôme diffus à larges cellules B, une corrélation entre l'expression de Bcl-2 et Bcl-xL et une faible réponse au traitement chimiothérapeutique ont été observées (Bairey *et al.,* 1999). Plusieurs publications récentes mettent en évidence le rôle des membres anti-apoptotiques dans la chimiorésistance (Buchholz *et al.,* 2003 ; Marriott *et al.,* 2003 ; Mounier *et al.,* 2003).

Par ailleurs, la résistance aux chimiothérapies par les membres de la famille Bcl-2 est étroitement liée aux taux d'expression de divers gènes suppresseurs de tumeurs. En effet, des études ont notamment montré que la perte des gènes suppresseurs de tumeur tels que p53, PTEN ou WT1 induisait la surexpression de Bcl-2 (Vogelstein *et al.,* 2000). Puisque p53 peut activer la transcription de molécules pro-apoptotiques comme Bax, Puma ou Noxa, les taux d'expression des membres de la famille Bcl-2 peuvent indirectement être affectés dans les tumeurs par la perturbation des voies de transduction de signaux.

4. Implication des membres de la famille Bcl-2 dans les maladies autres que les cancers.

Outre une large implication dans l'apparition et l'évolution des tumeurs, les membres de la famille Bcl-2 sont également impliqués dans le développement de pathologies autres que les cancers (Sorenson, 2004 ; Droin et Green, 2004). Par souci de concision, je ne citerai que quelques exemples sans entrer dans le détail.

Bcl-2 est particulièrement impliquée dans les pathologies rénales et notamment dans la maladie kystique rénale. Dans cette pathologie, l'épithélium rénal kystique est incapable d'atteindre un phénotype mature, probablement à cause d'une apoptose accrue est observée dans des régions de cellules non différenciées où Bcl-2 n'est pas exprimée (Winyard *et al.,* 1996a). En revanche, l'expression post-natale de Bcl-2 est conservée dans l'épithélium tubulaire dysplasique (Winyard *et al.,* 1996b). Ainsi, l'hyperprolifération et la formation des kystes dans les reins dysplasiques pourraient être dus au maintien d'un type cellulaire immature notamment par la fonction de survie de Bcl-2.

Un autre exemple est l'implication des membres de la famille Bcl-2 dans les pathologies neurodégénératives. Une étude montre que les protéines Bak, Bad, Bcl-2 et Bcl-x sont surexprimées dans le cerveau de patients atteints d'Alzheimer (Kitamura *et al.,* 1998). Une autre étude montre en revanche une diminution de l'expression de Bcl-2 dans des neurones à neurofibrilles enchevêtrées de la maladie d'Alzheimer (Vyas *et al.,* 1997).

Par ailleurs, compte tenu de l'expression de Bcl-2 dans les tissus lymphoïdes (LeBrun *et al.,* 1993) et de son implication notamment dans la maturation des lymphocytes (Nunez *et al.,* 1994 ; Lopez-Hoyos *et al.,* 1998), il est facilement concevable d'envisager que la protéine puisse être associées à des pathologies relatives au système immunitaire telles que les maladies auto-immunes (Eguchi, 2001 ; Manganelli et Fietta, 2003 ; Droin et Green, 2004).

5. Stratégies thérapeutiques axées sur les membres de la famille Bcl-2.

Les protocoles actuels de chimiothérapie et radiothérapie ont pour but d'éliminer les cellules tumorales proliférantes en sollicitant particulièrement la mort cellulaire programmée. Cependant, devant l'émergence de tumeurs résistantes aux traitements cytotoxiques conventionnels, la mise au point de nouvelles stratégies thérapeutiques s'avère indispensable. En effet, la surexpression de protéines anti-apoptotiques ainsi que la diminution d'expression de protéines pro-apoptotiques sont liées très fréquemment à une résistance acquise des tumeurs aux protocoles de radiothérapie et de chimiothérapie. En outre, il apparaît que plus de la moitié des cancers existants se caractérisent par une sur-expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL (Amundson *et al.,* 2000). L'idée qui en découle est de bloquer fonctionnellement les membres de la famille Bcl-2 ou de sur-exprimer des membres pro-apoptotiques afin de restaurer le processus apoptotique des cellules tumorales et de sensibiliser ces cellules aux radio- et chimiothérapies. A l'heure actuelle, différentes stratégies de thérapie anti-tumorale ciblant les membres de la famille Bcl-2 sont mises au point et sont mêmes déjà pour certaines en phase d'essai clinique (pour revue, Reed, 2003). Il s'en dégage trois types de stratégies :

- diminution de l'expression de protéines anti-apoptotiques de type Bcl-2 ou Bcl-xL soit par répression de leur transcription, soit par dégradation de leur ARNm par des oligonucléotides anti-sens (Konopleva et al., 2000 ; Waters et al., 2000 ; Chi *et al.,* 2001 ; Elez et al., 2003 ; Tanabe et al., 2003) ou par des ribozymes (Dorai et al., 1999 ; Gibson et al., 2000 ; Luzi *et al.,* 2003) ;

- interférence avec la fonction anti-apoptotique des protéines de type Bcl-2 ou Bcl-xL par des molécules de synthèse, des BH3 mimétiques ou des peptides BH3 (Wang *et al.,* 2000a et 2000b ; Degterev *et al.,* 2001 ; Shangary et Johnson, 2002 ; Tan *et al.,* 2003 ; Manero *et al.,* 2006) ;

- induction de l'apoptose par augmentation de l'expression ou par l'activation de protéines pro-apoptotiques comme Bax (Gu *et al.,* 2002 ; Letai *et al.,* 2002).

5. 1. Diminution de l'expression des protéines anti-apoptotiques.

5. 1. 1. Approche anti-sens.

L'utilisation d'un oligonucléotide anti-sens consiste à cibler l'ARNm d'une protéine cible, conduisant à sa dégradation et empêchant ainsi la synthèse *de novo* de cette protéine (Jansen et Zangemeister-Wittke, 2002). Cette approche a notamment été utilisée pour inhiber l'expression de protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1.

Actuellement, l'approche la plus avancée concerne l'utilisation d'un oligonucléotide anti-sens ciblant l'ARNm de la protéine Bcl-2 : le G3139 ou Genasense (Genta-Aventis), un oligonucléotide 18-mer phosphorothioate, permet de réduire les niveaux de Bcl-2 de plus de 80 % dans les cellules du cancer du sein *in vitro*. Le Genasense sensibilise les cellules tumorales à l'action des drogues cytotoxiques et induit leur mort cellulaire massive par une apoptose accrue (Chi *et al.,* 2000). En outre, dans des souris SCID (modèle de xénogreffe), le Genasense a permis de réduire la croissance de quelques tumeurs humaines transplantées (Schlagbauer-Wadl *et al.,* 2000 ; Lopes de Menezes et Mayer, 2002). A l'heure actuelle, le Genasense est testé dans un premier essai de phase III en association aux traitements usuels (Fludarabine + Cyclophosphamide) chez des patients atteints de leucémie lymphoïde chronique et également dans un deuxième essai de phase III, en association aux traitements usuels (dexaméthasone à haute dose), chez des patients atteints de myélome multiple. Un troisième essai testait l'utilisation du Genasense chez des patients atteints de mélanome malin mais a été abortif puisque la FDA (Food Drug Administration) a rejeté la commercialisation du produit (mai 2004).

Bcl-xL et Mcl-1 sont aussi des protéines cibles dans la stratégie des oligonucléotides anti-sens appliquée aux membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2.

Une étude a montré que l'utilisation d'un oligonucléotide anti-sens ciblant Bcl-xL permet d'inhiber la croissance de lignées cellulaires de mélanomes exprimant fortement cette protéine (Olie *et al.,* 2002). Cependant, les cellules normales, les mélanocytes, expriment de forts taux de Bcl-2 et Bcl-xL et leur viabilité se trouve considérablement réduite suite à l'utilisation de cette thérapie. De façon intéressante, une étude a montré qu'un oligonucléotide anti-sens ciblant Bcl-xL est capable de changer le profil d'épissage alternatif du pré-ARNm de Bcl-xL en Bcl-xS, ce qui permet de promouvoir la mort des cellules étudiées (Mercatante *et al.,* 2002). De même, Taylor et coll. ont induit l'expression de Bcl-xS à travers le contrôle de l'épissage de Bcl-x par des oligonucléotides anti-sens dirigés contre Bcl-x (Taylor *et al.,* 1999).

Un oligonucléotide anti-sens spécifique à la fois des protéines Bcl-2 et Bcl-xL a été testé dans diverses cellules tumorales sur-exprimant ces deux protéines ; les résultats ont montré que cet oligonucléotide permettait de faire diminuer les taux de Bcl-2 et Bcl-xL et d'induire l'apoptose dans ces cellules (Gautschi *et al.,* 2001 ; Jiang *et al.,* 2003).

Enfin, une étude a montré que l'utilisation d'un oligonucléotide anti-sens ciblant Mcl-1 permet de sensibiliser des cellules de myélomes multiples réfractaires à la chimiothérapie (Derenne *et al.,* 2000). Les oligonucléotides anti-sens dirigés contre Mcl-1 ont également été testés en tant qu'outils anti-cancéreux potentiels en association avec de faibles doses de cyclophosphamide (Thallinger *et al.,* 2004). Les résultats très encourageants de l'étude montrent un effet synergique des deux traitements.

5. 1. 2. Approche ARN interférence.

L'ARN interférence est un processus par lequel des siARN (small interfering RNA ou petits ARN interférants), petites molécules d'ARN double brin de 21 à 22 nucléotides, avec des extrêmités protrudantes simple brin, inhibent de façon spécifique l'expression d'un gène cible. Cette approche d'ARN interférence est mise à profit dans le but d'inhiber la production d'un membre anti-apoptotique de la famille Bcl-2. Par exemple, une première étude a montré qu'un siARN dirigé contre Bcl-2 permettait d'induire l'apoptose dans les cellules HeLa (Futami *et al.,* 2002). En outre, Lima et coll. (2004) ont montré que des siARN dirigés contre Bcl-2 d'une part et

XIAP d'autre part, promouvaient l'effet de l'étoposide ou de la doxorubicine dans la lignée cellulaire MCF-7 de cancer du sein.

5. 1. 3. Approche ribozyme.

Les ribozymes sont des molécules d'ARN auto-catalytiques capables d'inhiber l'expression de gènes par clivage des séquences d'ARN. Cette approche a notamment été utilisée dans une étude qui rapporte que l'utilisation d'un ribozyme synthétique dirigé contre un élément régulateur de l'ARNm de Bcl-2 (impliqué dans l'extinction de l'expression de Bcl-2 durant le processus apoptotique) permet de réduire considérablement les taux de Bcl-2 dans des cellules de lymphômes résistantes à l'apoptose et d'augmenter la mort de ces cellules par apoptose (Luzi *et al.,* 2003).

5. 2. Inhibition fonctionnelle des protéines anti-apoptotiques.

Afin de bloquer la fonction de protéines anti-apoptotiques, différentes stratégies visant à inhiber directement la protéine ont été entreprises : les molécules naturelles ou de synthèse, les BH3 mimétiques ou les peptides BH3.

5. 2. 1. Les BH3 mimétiques.

De nombreux groupes ont développé de petites molécules, dites des BH3 mimétiques, susceptibles d'interagir avec la poche hydrophobe de Bcl-2 et d'inactiver ainsi la protéine

Ainsi, Wang JL. et coll. (2000a) ont montré que la molécule HA14-1, une petite molécule organique isolée *via* une stratégie de criblage par ordinateur basée sur la structure prédictive de la protéine Bcl-2, interagissait avec cette protéine et induisait l'apoptose de cellules tumorales HL60 sur-exprimant cette protéine, *in vitro*. L'effet apoptotique de ce composé nécessite la translocation de Bax vers la mitochondrie (Chen J *et al.,* 2002). Il a récemment été montré au laboratoire que HA14-1 augmente la sensibilité des glioblastomes humains à la radiothérapie et à la chimiothérapie (Manero *et al.,* 2006). Cet effet est perdu lorsque l'expression de Bcl-2, mais pas celle de Bcl-xL, est inhibée, mais aussi lorsque les cellules expriment un mutant de Bax incapable d'interagir avec Bcl-2. Ceci indique que HA14-1 agit spécifiquement pour inhiber la fonction de Bcl-2 et que cela implique l'interaction de Bcl-2 avec Bax. En outre, HA14-1, en combinaison avec un traitement cytotoxique, ralentit la croissance de glioblastomes *in vivo*.

De la même manière, par une stratégie de criblage sur ordinateur basée sur la structure tri-dimensionnelle de Bcl-2, Enyedy et coll. (2001) ont isolé de petites molécules capables de prévenir la liaison de Bcl-2 à un peptide BH3 et induisant l'apoptose dans des cellules cancéreuses présentant des taux élevés de Bcl-2.

5. 2. 2. Les peptides BH3.

Une autre stratégie consiste à développer des peptides BH3 correspondant au domaine BH3 de protéines pro-apoptotiques comme Bax ou Bak, afin d'empêcher la séquestration des membres pro-apototiques par les protéines de survie.

Ainsi, un peptide BH3 synthétique introduit dans des cellules de carcinomes de la prostate, empêche l'hétérodimérisation Bak/Bcl-2 induisant ainsi l'apoptose de ces cellules (Finnegan *et al.,* 2001). De façon similaire, un peptide dérivé du domaine BH3 de Bad, fusionné à un acide gras pour permettre la perméabilité cellulaire, induit une inhibition de la croissance de cellules HL-60 exprimant Bcl-2 (Wang JL *et al.,* 2000b). En outre, une équipe a conçu des peptides à partir du domaine BH3 de Bax fusionné à l'Ant (Antennapedia plasma domain translocation) afin de faciliter la pénétration cellulaire ; les molécules induisent une perméabilité mitochondriale par un mécanisme qui n'est pas inhibé par Bcl-2 ou Bcl-xL (Vieira *et al.,* 2002). La structure

tridimensionnelle du complexe Bcl-xL/Bak a également permis de concevoir des peptidomimétiques dirigés contre la protéine anti-apoptotique Bak (Orner *et al.,* 2001).

5. 2. 3. Les composés naturels.

Enfin, quelques études récentes ont montré que les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 pouvaient être bloqués par des composés naturels tels que les polyphénols (Pellecchia et Reed, 2004). De façon très intéressante, des molécules comme le gossypol apogossypol, la purpurogalline, les catéchines du thé vert et les théflavines du thé noir présentent des activités anti-tumorales. Leur mode d'action impliquerait notamment une liaison et une inhibition des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Kitada *et al.,* 2003 ; Leone *et al.,* 2003) D'autres études ont montré que des petites molécules telles que l'antimycine A liaient Bcl-2 et Bcl-xL et qu'elles perturbaient l'interaction entre Bcl-2/Bcl-xL et le domaine BH3 des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, induisant ainsi la mort cellulaire (Degterev *et al.,* 2001 ; Tzung *et al.,* 2001 ; Zheng, 2001). Une autre étude rapporte que la chélérythrine inhibe la fonction de Bcl-xL (Chan *et al.,* 2003) : elle est capable d'inhiber la liaison du peptide BakBH3 à Bcl-xL et déplace Bax de Bcl-xL, et induit l'apoptose des cellules par la voie mitochondriale.

5. 3. Augmentation de l'expression ou activation de protéines pro-apoptotiques : le cas de Bax.

5. 3. 1. Augmentation de l'expression de Bax.

Toutes approches destinées à rétablir une sensibilité mitochondriale aux agonistes de mort représentent une stratégie attractive pour lutter contre la résistance tumorale. Des études basées sur la sur-expression de Bak et de Bax respectivement ont montré l'intérêt d'une telle stratégie

(Pataer *et al.,* 2001 ; Sugimoto *et al.,* 1999). L'introduction d'un adénovirus codant pour la protéine Bax dans des cellules LNCaP de cancer de la prostate a permis d'induire l'apoptose dans ces cellules surexpriment Bcl-2 (Lowe *et al.,* 2001). Cependant, dans les premières utilisations, les adénovirus codant pour Bax se sont révélés hautement toxiques (Kagawa *et al.,* 2000 ; Juin *et al.,* 2004). L'approche a donc été améliorée afin de cibler les cellules cancéreuses de façon spécifique. Gu et coll. ont mis au point un adénovirus recombinant dont l'expression de Bax est dirigé par le promoteur de la reverse transcriptase télomérase humaine (Gu *et al.,* 2000). Dans des modèles tumoraux issus de xénogreffes, cet adénovirus induit l'expression de Bax spécifiquement dans les cellules cancéreuses et permet d'éradiquer la croissance tumorale. Des essais cliniques en phase III et en phase I testant respectivement l'effet de l'induction de l'expression de Bax après transfection par des « p53-adenovirus » et l'effet des transfections « Bax-adenovirus » sur le contrôle local de cancers sont en cours (Gu *et al.,* 2002).

5. 3. 2. Activation de l'expression de Bax.

Une nouvelle alternative consiste à activer Bax par l'utilisation de drogues mimant les peptides agonistes BH3. Ainsi, il a été démontré que de courts peptides représentant l'hélice α du domaine BH3 de Bid ou de Bim sont capables d'induire l'oligomérisation de Bax et Bak et le relargage de cytochrome *c* (Letai *et al.,* 2002).

CONCLUSION.

Mieux connaître les mécanismes et modifications par lesquels les constituants de la machinerie apoptotique contribuent aux processus pathologiques permettrait le développement d'approches thérapeutiques plus efficaces, de plus haute spécificité et donc plus tolérables. Cela inclut l'activation ciblée de suppresseur de tumeurs pro-apoptotiques ou alternativement le blocage d'oncogènes anti-apoptotiques dans le cas de cancers, alors que pour le traitement de mort cellulaire prématurée dans le cas de maladies neurodégénératives l'inhibition de constituants pro-apoptotiques clés peut être prometteur (pour revue, Reed, 2002).

PROJET DE THESE.

L'apoptose est un processus de mort cellulaire génétiquement programmée que la cellule est capable de déclencher en réponse à des stimuli hormonaux ou à des lésions (irradiations, privation en facteurs de croissance…). Sa dérégulation est impliquée dans la formation et la progression tumorale, les métastases ainsi que la survenue de résistances multiples aux drogues (MDR, multi-drug resistance) au cours des thérapies anti-cancéreuses (Johnstone *et al.,* 2002). Ainsi, l'étude des mécanismes moléculaires de l'apoptose s'avèrent d'un vif intérêt, d'autant plus que l'apoptose est le processus par lequel agissent la radiothérapie et la chimiothérapie. La mise au point de nouvelles stratégies thérapeutiques anti-cancéreuses visant à déclencher le processus apoptotique de manière spécifique dans les cellules tumorales nécessite la compréhension des mécanismes moléculaires de l'apoptose. Dans ce contexte, les approches destinées à rétablir une sensibilité mitochondriale aux agonistes de mort s'avèrent être une stratégie attractive pour lutter contre la résistance tumorale.

L'activation de la protéine pro-apoptotique Bax représente une étape cruciale dans le déroulement de la cascade apoptotique. En effet, Bax est impliquée dans l'évènement de perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MME) et induit la libération de facteurs apoptogènes mitochondriaux (cytochrome c, AIF, Smac/Diablo) qui déclenchent et amplifient la phase effectrice de la mort cellulaire. Les étapes constituées par le changement conformationnel de la protéine Bax, son adressage à la mitochondrie, son insertion dans la MME et son oligomérisation représentent des cibles fondamentales intéressantes pour intervenir pharmacologiquement dans le processus apoptotique.

Dans ce contexte, mon projet de thèse a consisté en une recherche fondamentale sur l'étude de la relation structure/fonction de la protéine pro-apoptotique Bax. En effet, la protéine Bax semble posséder un fonctionnement différent par rapport aux autres protéines de la famille Bcl-2, notamment par rapport aux protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 ou Bcl-xL.

La plupart des travaux concernant les protéines de la famille Bcl-2 rapporte que les protéines pro-apoptotiques (Bax et Bak) sont sous forme inactive hors contexte apoptotique alors que leurs antinomiques (Bcl-2 et Bcl-xL) semblent être sous une conformation active pour réprimer tout

stimulus apoptotique. En condition normale, la protéine Bax est maintenue inactive dans le cytosol ou est retrouvée faiblement associée à la mitochondrie (Hsu YT *et al.,* 1997 ; Wolter *et al.,* 1997), alors que la protéine Bcl-2 est localisée au niveau mitochondrial où elle est insérée à la membrane mitochondriale externe (MME) *via* son extrémité C-terminale (Borner *et al.,* 1994a). La délétion de l'extrémité C-terminale de Bcl-2 conduit à une localisation cytoplasmique de Bcl-2 où elle conserve ses propriétés de protéine de survie (Borner *et al.,* 1994a). Ce résultat suggère que l'extrémité C-terminale de Bcl-2 est le domaine d'adressage à la mitochondrie et le domaine transmembranaire (Borner *et al.,* 1994a). Suite à un stimulus apoptotique, Bax subit des changements conformationnels (Nechushtan *et al.,* 1999), est adressée à la mitochondrie où elle s'insère à la MME (Hsu YT *et al.,* 1997 ; Gross *et al.,* 1999) et induit le relargage de facteurs apoptogènes de cet organelle (Martinou et Green, 2001). Par homologie aux autres membres de la famille Bcl-2 qui s'ancrent à la MME par leur extrémité C-terminale, il a été postulé que Bax cible la mitochondrie par son domaine C-terminal (Borner, 2003). Cependant, la situation pour Bax semble plus complexe. Malgré l'homologie de son extrémité C-terminale avec celle de Bcl-2, le domaine C-terminal de Bax ne présente pas les caractéristiques d'un signal d'adressage mitochondrial conventionnel. En effet, il a été montré que l'extrémité C-terminale de Bax ne pouvait permettre l'adressage d'une protéine rapporteur à la mitochondrie (Cartron *et al.,* 2003b ; Nechushtan *et al.,* 1999 ; Tremblais *et al.,* 1999). Nous avons montré au laboratoire que le signal d'adressage à la mitochondrie de Bax se situe au niveau de sa partie N-terminale contenant l'hélice α1 (Cartron *et al.,* 2003b). Dans ce contexte, mon travail de thèse a consisté à déterminer le rôle de l'extrémité C-terminale de la protéine pro-apoptotique Bax dans les évènements de relocalisation mitochondriale, de multimérisation et d'ancrage transmembranaire (**Article 1**).

Par la suite, nous avons importé au laboratoire la méthode des BN-PAGE (Blue Natif Polyacrylamide Gel Electrophoresis) afin d'étudier le comportement de Bax et de BaxΔC (Bax délétée de sa partie C-terminale) au sein de complexes moléculaires en condition normale et en condition apoptotique. Cette méthode permet d'analyser la masse moléculaire et l'oligomérisation de protéines en conditions natives et d'estimer la taille des complexes protéiques membranaires dans lesquels se trouve la protéine d'intérêt par électrophorèse bidimensionnelle. Par cette méthode, nous souhaitions mettre en évidence une différence de comportement de Bax et de BaxΔC au sein de complexes protéique (**Article 1**), ainsi que déterminer un ou des récepteurs mitochondriaux de la protéine Bax qui participeraient au processus de régulation de la perméabilisation de cet organelle (**Article 2**).

Enfin, nous avons également entrepris la purification de la protéine pro-apoptotique Bax afin d'étudier sa structure dans des bicouches lipidiques en collaboration avec le laboratoire de Résonance Magnétique Nucléaire de la Matière Condensée dirigé par le Professeur Burkhard Bechinger à l'ISIS à Strasbourg. Il nous semblait primordial de comprendre comment Bax s'insère dans une bicouche lipidique et quelle structure elle adopte dans un contexte membranaire afin d'élucider les mécanismes de perméabilisation de la mitochondrie.

MATERIELS ET METHODES

I. MATERIELS BIOLOGIQUES

1. Souches bactériennes.

Les différentes souches utilisées au cours de ma thèse sont listées dans le tableau 10.

Souche *Escherichia coli*	Génome	Particularité	Utilisation
DH5α	F', ϕ80δ*lac*ZΔM15, Δ(*lac*ZYA, *arg*F) U169, *deo*R, *rec*A1, *end*A1, *hsd*R17(r_K^-,m_K^+), *pho*A, *sup*E44, λ^-, *thi*-1, *gyr*A96, *rel*A1		clonage et amplification
XL-1 Blue	*recA*1, *endA*1, *gyrA*96, *thi*-1, *hsdR*17(r_K^-, m_K^+), *supE*44, *relA*1, *lac*, [F', *proAB*, *lacI*qZΔM15::Tn10(tet^r)]		clonage et amplification
DH5α-T1^R (Invitrogen)	F- φ80*lac*ZΔM15 Δ(*lac*ZYA-*arg*F) U169 *deo*R *rec*A1 *end*A1 *hsd*R17 (rk-, mk+) *pho*A *sup*E44 λ- *thi*-1 *gyr*A96 *rel*A1 *ton*A	gène de résistance aux phages T1 et T5 (gène *ton*A)	mutagenèse dirigée (GeneTailor)
XL-10	(Tetr Δ(*mcrA*)*183* Δ(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)*173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* Hte [F´ *proAB lacI*q*Z*Δ*M15* Tn*10* (Tetr) Tn5 (Kanr) Amy]	hauts rendements d'amplification	propagation de plasmides
DB3.1 (Invitrogen)	F- *gyr*A462 *end*A Δ(*sr*1-*rec*A) *mcr*B *mrr hsd*S20 (rB- mB-) *sup*E44 *ara*14 *gal*K2 *lac*Y1 *pro*A2 *rps*L20(StrR) *xyl*5 λ- *leu mtl*1	allèle *gyr*A462 rend cette souche résistante à l'effet toxique du gène *ccd*B,	propagation des plasmides du système Gateway (Invitrogen)
BL21(DE3)pLysS (Invitrogen)	F- *ompT hsdS*B (rB-mB-) *gal dcm* (DE3) pLysS (CamR)		expression de protéines hétérologues
BL21(DE3)pLysE (Invitrogen)	F- *ompT hsdS*B (rB-mB-) *gal dcm* (DE3) pLysE (CamR)		expression de protéines hétérologues

Tableau 100 : Souches bactériennes utilisées : génome, particularité et utilisation.

2. Plasmides.

Les plasmides décrits ci-dessous ont été utilisés pour le clonage, l'amplification et le séquençage de l'ADN, comme intermédiaire de construction ou comme vecteurs d'expression protéique *in vitro*, dans les bactéries ou dans les cellules de mammifères (voir aussi figure 32).

2. 1. Vecteurs de clonage.

2. 1. 1. pCR II-TOPO (Invitrogen).

Les produits de PCR sont directement clonés dans le vecteur pCR II-TOPO (« TOPO TA Cloning kit », Invitrogen) présenté figure 32. Le principe de ce clonage repose sur la présence d'une thymine protudente à chaque extrémité 3' du vecteur linéarisé et sur l'action de la Topoisomérase I du virus *Vaccinia* lié de façon covalente au vecteur. La Topoisomérase I agit comme une enzyme de restriction et comme une ligase. Son rôle biologique est de cliver et de religuer l'ADN au cours de la réplication. La Topoisomérase I du virus Vaccinia reconnaît spécifiquement la séquence pentamérique 5' (C/T)CCTT 3' et forme un lien covalent avec le groupement phosphate de la thymidine en 3'. Elle clive un brin de l'ADN, permettant le déroulement de l'ADN. L'enzyme religue ensuite les extrémités des brins clivés et se libère de l'ADN. Les produits de PCR exposant une adénine protudente en 3', due à l'activité « terminal transférase » de la *Taq* polymérase sont ainsi clonés de façon hautement efficace et rapide. Ce plasmide, pourvu d'une origine de réplication d'*E. coli*, porte trois marqueurs de sélection : les marqueurs de transformation Amp^R et Kan^R codant respectivement pour la résistance à l'ampicilline et à la kanamycine, et le marqueur de recombinaison codant pour le peptide α de la β-galactosidase. Ce peptide permet de complémenter le phénotype [β gal^-] des bactéries utilisées (α-complémentation). Ce système permet le criblage rapide des clones recombinants sur des boîtes contenant du X-Gal (sélection bleu/blanc).

2. 1. 2. pGEM-T Easy (Promega)

pGEM-T Easy (figure 32) permet le clonage de produits de PCR exposant une adénine protudente en 3'. Ce plasmide, pourvu d'une origine de réplication d'*E. coli* ainsi que du phage f1, porte deux marqueurs de sélection : le marqueur de transformation Amp^R codant pour la résistance à l'ampicilline et le marqueur de recombinaison codant pour le peptide α de la β-galactosidase (*lac*Z). Ce peptide permet de complémenter le phénotype [β gal^-] des bactéries utilisées (α-complémentation). Ce système permet le criblage rapide des clones recombinants sur

des boîtes contenant du X-Gal (sélection bleu/blanc). Le site de clonage multiple, flanqué des promoteurs des ARN polymérases T7 et SP6, se trouve dans le gène *lac*Z.

2. 1. 3. pDONR 201 (Invitrogen)

pDONR 201 (figure 32) possède une origine de réplication d'*E. coli* et trois marqueurs de sélection: les marqueurs de transformation Kan^R et Cm^R codant respectivement pour la résistance à la kanamycine et au chloramphénicol, et le marqueur *ccd*B codant pour une protéine toxique pour la plupart des souches d'*E. coli*. Ce vecteur possède en outre les sites *att*P1 et *att*P2 qui permettent le clonage de produits de PCR flanqués par les sites *att*B1 et *att*B2 par une réaction de recombinaison (réaction BP, système Gateway, Invitrogen). Le principe de ce clonage est détaillé § **II - 13**.

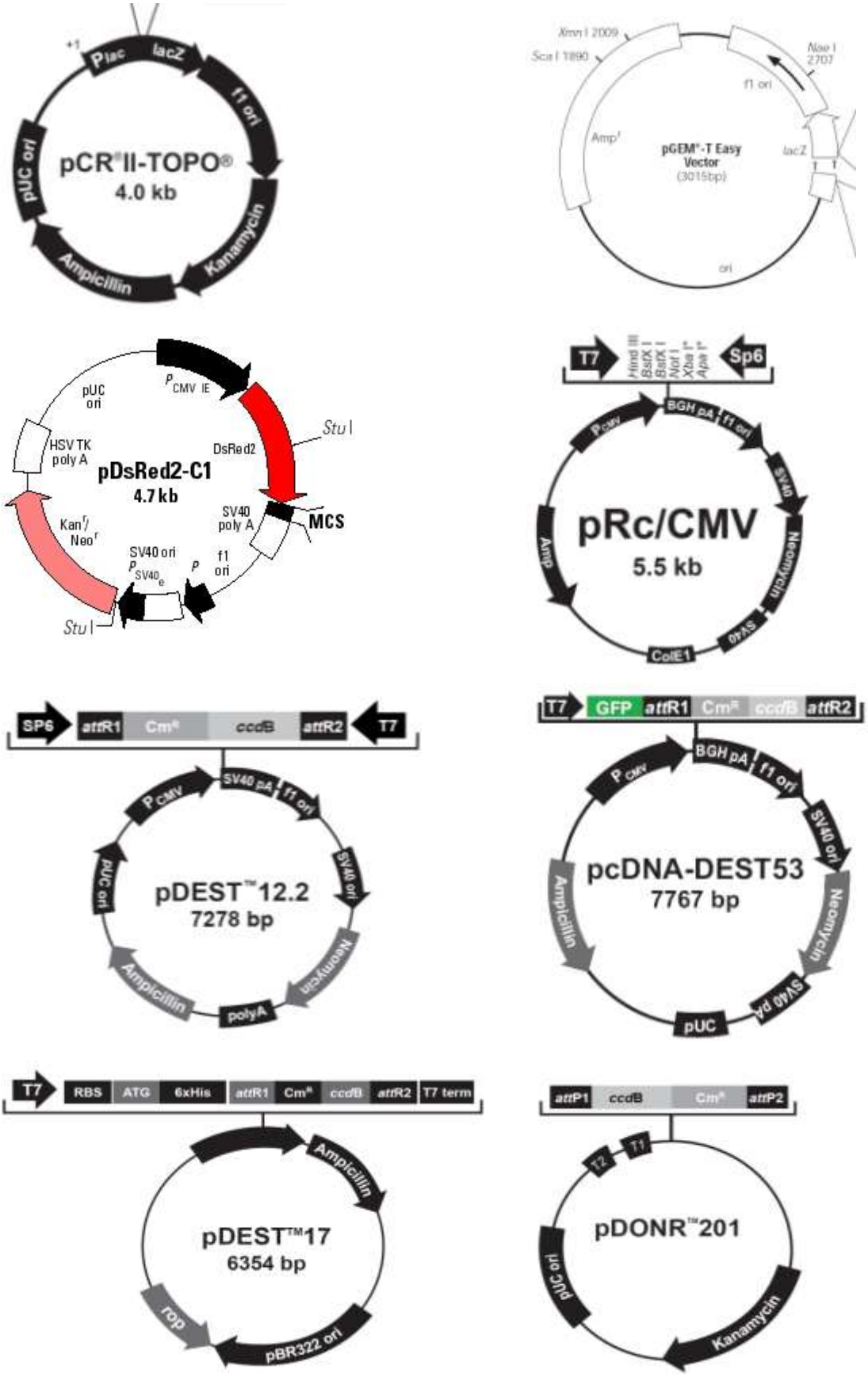


Figure 32 : Carte des différents vecteurs utilisés au cours de ma thèse.

2. 2. Vecteurs d'expression dans les cellules de mammifères.

2. 2. 1. pDEST 12.2 (Invitrogen)

pDEST 12.2 (figure 32) permet l'expression de protéines d'intérêt dans les cellules de mammifères grâce au promoteur de cytomégalovirus. Ce vecteur, pourvu d'une origine de réplication d'*E. coli* ainsi que celle du phage f1, porte trois marqueurs de sélection : le marqueur de transformation conférant la résistance à l'ampicilline, le gène *ccd*B codant pour une protéine toxique pour la plupart des souches d'*E. coli* et le marqueur de transfection conférant la résistance à la néomycine. Le plasmide possède en outre les sites *att*R1 et *att*R2 permettant le clonage du gène d'intérêt flanqué des sites *att*B1 et *att*B2 par une réaction de recombinaison (réaction LR, système Gateway, Invitrogen). Le principe de ce clonage est détaillé § **II - 13**.

2. 2. 2. pRc/CMV (Invitrogen)

pRc/CMV (figure 32) permet l'expression de protéines d'intérêt dans les cellules de mammifères grâce au promoteur du cytomégalovirus. Ce vecteur confère la résistance à la néomycine, permettant ainsi de sélectionner les cellules transfectées. Il possède en outre l'origine de réplication d'*E. coli* et le marqueur de résistance à l'ampicilline, permettant son amplification dans cette souche.

2. 2. 3. pDsRed2-C1 (Clontech).

pDsRed2-C1 (figure 32) code pour DsRed2, un variant de DsRed amélioré afin d'obtenir une maturation plus rapide et de plus faibles agrégations non spécifiques. DsRed2, tout comme DsRed, est un dérivé de la protéine fluorescente rouge de *Discosoma sp.* Leurs séquences codantes ont été modifiées afin d'obtenir une expression plus efficace dans les cellules de mammifères, une apparition de la fluorescence rouge plus rapide et une moindre agrégation aspécifique. La cassette de clonage (MCS) de pDsRed2-C1 est entre la séquence codant pour

DsRed2 et le signal de polyadénylation SV40 (SV40 poly A). L'efficacité de la traduction dans les cellules eucaryotes est augmentée grâce à une séquence consensus de Kozak situé en amont de DsRed2. Le vecteur contient également une origine SV40 pour la réplication dans les cellules de mammifères exprimant l'antigène-T SV40, une origine de réplication bactérienne (pUC) et une origine f1 pour la production d'ADN simple brin. Une cassette de résistance à la néomycine (Neo^R), constituée du promoteur précoce de SV40, du gène de résistance néomycine/kanamycine de Tn5 et des signaux de polyadénylation du gène de la thymidine kinase du virus Herpes simplex (HSV TK), permet la sélection de cellules transfectantes stables par le G418. Un promoteur bactérien en amont de cette cassette permet l'expression de la résistance à la kanamycine dans *E. coli*. pDsRed2-C1 peut être utilisé pour construire des protéines de fusion en C-terminal de DsRed2. Le gène d'intérêt doit être cloné en phase avec la séquence codante de DsRed2 en prenant soin de ne pas créer de codon-stop dans la phase de lecture. Le vecteur recombinant peut être ensuite transfecté dans des cellules eucaryotes et des transformants stables peuvent être sélectionnés grâce au marqueur de sélection G418. pDsRed2-C1 peut aussi être utilisé comme marqueur de co-transfection ; en effet, le vecteur non modifié exprime DsRed2.

2. 2. 4. pcDNA-DEST 53.

pcDNA-DEST 53 (figure 32) permet l'expression de protéines d'intérêt fusionnées à la GFP (Green Fluorescent Protein) dans les cellules de mammifères. Le tag est en N-terminal de la protéine. Ce vecteur possède les mêmes caractéristiques que le vecteur pDEST 12.2.

2. 3. Vecteur d'expression dans les bactéries : pDEST 17.

pDEST 17 (Invitrogen) (figure 32) permet l'expression de protéines d'intérêt avec un tag 6 x Histidine en N-terminal dans des cellules bactériennes en présence d'ARN polymérase T7. Il possède l'origine de réplication d'*E. coli* (pBR322) et trois marqueurs de sélection : les marqueurs de résistance à l'ampicilline et au chloramphénicol et le gène *ccd*B codant pour une protéine toxique pour la plupart des souches d'*E. coli*. Le plasmide possède en outre les sites *att*R1 et *att*R2 permettant le clonage du gène d'intérêt flanqué des sites *att*B1 et *att*B2 par une

réaction de recombinaison (réaction LR, système Gateway, Invitrogen). Le principe de ce clonage est détaillé § **II - 13**.

3. Oligonucléotides utilisés.

3. 1. Oligonucléotides utilisés pour le clonage et/ou le séquençage.

Nom	Séquence
BAX GW SENS	5'**GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT**TA atg gac ggg tcc ggg gag cag ccc 3'
BAX GW ANTISENS	5' **GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT**C gcc cat ctt ctt cca gat ggt gag t 3'
BAX DELTA C GW ANTISENS	5' **GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT**C ctg cca cgt ggg cgt ccc aaa gta g 3'
xL Bax C GW Sens	5'**GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT**TA atg tct cag agc aac cgg gag ctg g 3'
xL Bax C GW Antisens	5' **GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT**C tca gcc cat ctt ctt cca gat ggt g 3'
BaxTMxL Antisens	5' **GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT**C tca ttt ccg act gaa gag tga gcc c 3'
BAX ΔC GW FUSION N-TER AS	5' **GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT**C tca ctg cca cgt ggg cgt ccc aaa g 3'
BAX GATEWAY AS	5' **GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT**C tca gcc cat ctt ctt cca gat ggt gag 3'
BAX GATEW SENS	5'**GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT**TAGAAGGAGATAGAACC atg gac ggg tcc ggg gag cag ccc ag 3'
FLAG BAX SENS	5' ATGGACTACAAAGACGATGACGAC AAG GAC GGG TCC GGG GAG CAG CCC AGA G 3'
BAX DELTA C ANTISENS	5' TCA CTG CCA CGT GGG CGT CCC AAA GTA 3'
BAX ANTISENS	5' TCA GCC CAT CTT CTT CCA GAT G 3'
FLAG GATEWAY SENS	**5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT**TA GAAGGAGATAGAACC ATG GAC TAC AAA GAC GAT GAC GAC 3'

Tableau 11 : Séquences des oligonucléotides utilisés pour le clonage et/ou le séquençage.

3. 2. Oligonucléotides utilisés pour le séquençage.

Nom	Séquence
SP6	5' ATT TAG GTG ACA CTA TAG 3'
T7 Promoteur	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3'
T7 Terminateur	5' GCT AGT TAT TGC TCA GCG G 3'

Tableau 12 : Séquences des oligonucléotides utilisés pour le séquençage.

3. 3. Oligonucléotides utilisés pour la mutagenèse.

Nom	Séquence
BAX L63E FORWARD	5' AAGCTGAGCGAGTGTGAGAAGCGCATCGGGGAC 3'
BAX L63E REVERSE	5' GTCCCCGATGCGCTTCTCACACTCGCTCAGCTT 3'

Tableau 13 : Séquence des oligonucléotides utilisés pour la mutagenèse.

4. Anticorps utilisés.

4. 1. Anticorps primaires.

Anticorps	Fournisseur	Référence	Type	C°	WB	IC
Actine	Chemicon	MAB1501R	SM IgG1	1 mg/ml	1/1000	1/1000
Bak	Upstate	06-536-MN	LP IgG	1 mg/ml		
Bak (Ab-3) (C-term)	Oncogene (Calbiochem)	AM15	SM IgG2k	100 µg/ml	1/20	
Bak	Pharmingen	556396	LP IgG		1/1000	1/1000
Bax (43-61)	DakoCytomation	A3533	LP IgG	1,1 mg/ml	1/500	1/1500
Bax 6A7 (12-24)	R&D Systems	2281-MC	SM IgG1	1 mg/ml	1/1000	
Bax 6A7	Abcam	Ab5714	SM IgG1	100 µg/ml		1/100
Bax 2D2 (3-16)	R&D Systems	2282-MC	SM IgG1	1 mg/ml	1/1000	
Bax 2D2	Sigma	B8554	SM IgG1	1 mg/ml	1/1000	1/1000
Bcl-x	Transduction Lab.	610747	SM IgG1	250 µg/ml	1/500	1/500
Bcl-x	Transduction Lab.	610212	LP IgG	250 µg/ml	1/1000	1/1000
Bcl-2	DakoCytomation	M0887	SM IgG1	225 µg/ml	1/500	1/100
CytC	R&D Systems	MAB897	SM IgG2b	1 mg/ml	1/1000	
F1-ATPase	Molecular Probes (Interchim)	A-21350	SM IgG2b	1 mg/ml	1/1000	1/1000
FlagM2	Sigma		SM IgG1	1 mg/ml	1/500	1/500
MBP	Abcam	ab9084	LP IgG	1 mg/ml	1/500	
TOM22	Sigma	T6319	SM IgG1	1 mg/ml	1/1000	1/2000

Tableau 14 : anticorps primaires utilisés pour les immunoblots et/ou l'immunocytochimie. Légende : IgG : Immunoglobuline ; C° : concentration ; SM : souris monoclonal ; LP : lapin polyclonal ; CP : chêvre polyclonal ; RM : rat monoclonal ; WB : dilution utilisée en western-blot ; IC : dilution utilisée en immunocytochimie.

4. 2. Anticorps secondaires.

Anticorps	Fournisseur	Référence	Type	C°	WB	IC
Lapin Alexa Fluor 488 (vert)	Molecular Probes (Interchim)	A-11008	chêvre	2 mg/ml		1/400
Lapin Alexa Fluor 568 (rouge)	Molecular Probes (Interchim)	A-11011	chêvre	2 mg/ml		1/400
Lapin peroxydase	Biorad	75011		1,25 mg/ml	1/2000	1/2000
Souris Alexa Fluor (vert)	Molecular Probes (Interchim)	A-11001	chêvre	2 mg/ml		1/400
Souris Alexa Fluor (rouge)	Molecular Probes (Interchim)	A-11004	chêvre	2 mg/ml		1/400
Souris peroxydase	Biorad	75031		1,25 mg/ml	1/2000	1/1000

Tableau 15 : Anticorps secondaires utilisés pour les immunoblots et/ou l'immunocytochimie. Légende : C° : concentration ; CP : chêvre polyclonal ; WB : dilution utilisée en western-blot ; IC : dilution utilisée en immunocytochimie.

II. METHODES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE.

1. Milieux et conditions de culture bactérienne.

Les différentes souches bactériennes sont cultivées à 37 °C en milieu Luria Bertani liquide (milieu LB : 10 g/l de Bactotryptone, 5 g/l d'extraits de levure, 10 g/l NaCl, pH 7) sous agitation constante (225 rpm) ou en milieu 2xTY solide (milieu 2xTY : 16 g/l de Bactotryptone, 10 g/l d'extraits de levure, 5 g/l NaCl, 15 g/l d'agar, pH 7). Les milieux de cultures sont stérilisés par autoclavage 30 min à 120 °C. Le phénotype de résistance à un antibiotique conféré aux bactéries par les plasmides avec lesquels elles sont transformées est la plupart du temps la résistance à l'ampicilline, à la kanamycine et/ou au chloramphénicol. Afin de maintenir une pression de sélection en faveur des cellules portant un plasmide, l'antibiotique est ajouté au milieu de culture à la concentration indiquée dans le tableau 16.

Antibiotique	Concentration usuelle
Ampicilline	100 µg/ml
Kanamycine	50 µg/ml
Chloramphénicol	34 µg/ml
Tétracycline	10 µg/ml

Tableau 16 : Concentration usuelle des antibiotiques.

2. Transformations de cellules bactériennes.

Le but de cette opération est d'introduire les constructions de biologie moléculaire dans un hôte capable de les répliquer. Environ 24 h après avoir été étalées sur boîtes de milieu 2xTY agar contenant l'antibiotique de sélection, les cellules transformées forment des clones individualisés qui seront testés pour l'intégrité de la construction qu'ils ont amplifiée.

Cette étape d'amplification des constructions est nécessaire pour avoir suffisamment de matériel et vérifier ensuite la séquence des constructions avant de les introduire éventuellement dans les cellules humaines.

Différentes techniques chimiques ont été utilisées pour la transformation bactérienne :

- la méthode au chlorure de rubidium décrite par Hanahan D. en 1985 ;
- la méthode au chlorure de calcium décrite par Sambrook et *al.* en 1989 ;
- et plus régulièrement, la méthode au DMSO, dite méthode TSS (Transformation and Storage of bacterial cells in the Same solution), décrite par Chung et *al.* en 1989.

Cette dernière méthode permet d'obtenir une efficacité de transformation bactérienne qui va jusqu'à 2 x 10^8 ufc/µg d'ADN plasmidique et ceci pour la plupart des souches d'*E. coli* utilisées pour le clonage.

2. 1. Préparation de bactéries compétentes au TSS.

A partir d'une pré-culture de bactéries sur la nuit, 20 ml de milieu LB additionné ou pas de tétracycline (10 µg/ml) sont cultivés à 37 °C. Lorsque l'absorbance à 600 nm atteint 0,3 à 0,6, les bactéries sont centrifugées 5 min à 4 500 g à 4 °C. Le culot est remis en suspension avec la solution de TSS froide (TSS : polyéthylène glycol 6000 10 % (wt/vol), DMSO 5 % (vol/vol) et 50 mM Mg^{2+} dans du milieu LB à pH 7, filtré 0,22 µm) à raison de 100 µl de TSS pour 1ml de suspension bactérienne centrifugée. Les cellules compétentes sont aliquotées par 100 µl et utilisées immédiatement pour la transformation.

2. 2. Transformation des bactéries rendues compétentes au TSS.

Les bactéries compétentes sont mélangées à l'ADN plasmidique et incubées 30 min sur la glace. Ce mélange est ensuite placé 2 min à 42 °C puis 2 min dans la glace. 1 ml de milieu SOC (milieu SOC : extrait de levure 0,5 %, Bactotryptone 2 %, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, $MgCl_2$ 10 mM, $MgSO_4$ 20 mM, glucose 20 mM) est ajouté et le tout est incubé 1 h à 37 °C sous agitation. Les bactéries sont alors étalées sur milieu 2xTY agar contenant l'antibiotique de sélection. Le volume de culture étalée diffère si le plasmide est issu d'une ligation (la totalité de la culture est alors étalée après une centrifugation pour concentrer les bactéries) ou s'il est déjà prêt (50 à 100 µl). La sélection des bactéries transformées se fait par la résistance à l'antibiotique conférée par le plasmide.

3. Minipréparation rapide d'ADN plasmidique à partir des bactéries transformées.

Des colonies bactériennes sont prélevées sur les boîtes de gélose. Chacune des colonies est inoculée dans 5 ml de milieu LB liquide supplémenté par l'antibiotique de sélection. Ces échantillons sont incubés à 37°C sous agitation constante (225 rpm), une nuit. Un souchier est réalisé, en mélangeant stérilement 700 µl de suspension bactérienne à 300 µl de glycérol et stocké à - 80°C, le reste de la suspension est centrifugé (à 4 °C, 15 min). L'ADN plasmidique contenu dans le culot bactérien est purifié suivant le protocole du kit « Qiaprep spin » (Qiagen).

4. Midipréparation.

Cette technique est utilisée pour la production d'ADN plasmidique en grande quantité. Une fraction du souchier correspondant au plasmide recombinant est ensemencée dans 100 ml de milieu LB, en présence de l'antibiotique de sélection. L'ensemble est incubé une nuit à 37°C sous agitation constante (225 rpm). Le protocole appliqué pour l'isolement de plasmide est celui du kit

« Plasmid Midi Prep » (Qiagen). La pureté des ADN extraits suivant cette préparation permet de les utiliser soit pour la transfection de cultures cellulaires soit pour la microinjection de cellules.

5. Dosage de l'ADN ou de l'ARN.

L'ADN (ou l'ARN) est quantifié par mesure de l'absorbance à 260 nm (spectrophotomètre Uvikon 922, UVK-Lab) et la pureté de l'échantillon est évalué par le rapport DO_{260nm}/DO_{280nm}. L'absorbance à 280 nm donne une estimation de la quantité de protéines dans l'échantillon.
La concentration de l'ADN double brin est déterminée à partir de la relation suivante :
[ADN] = (DO_{260nm} * facteur de dilution * 50) / 1 000 = concentration en ADN en µg/µl.
L'échantillon d'ADN est considéré pur si ce rapport est supérieur à 1,7.
La concentration de l'ARN est déterminée à partir de la relation suivante :
[ARN] = (DO_{260nm} * facteur de dilution * 25) / 1 000 = concentration en ARN en µg/µl.
L'échantillon d'ARN est considéré pur si ce rapport est supérieur à 2.

6. Séquençage des constructions de biologie moléculaire.

Les plasmides sont vérifiés par séquençage réalisée par un laboratoire privé spécialisé, Genomexpress (https://www.gexbyweb.com). Le plasmide est séquencé soit avec un oligonucléotide s'hybridant sur le vecteur en amont de l'insert, soit avec un oligonucléotide s'hybridant sur l'insert. Le chromatogramme obtenu est lu et vérifié avec le logiciel Chromas2 (http://www.technelysium.com.au/chromas.html) et la séquence obtenue est comparée à la séquence attendue par des alignements de séquences réalisés à l'aide du logiciel LALIGN (http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html) proposé sur le serveur de biologie moléculaire EMBnet (http://www.ch.embnet.org).

7. Mutagenèse dirigée.

Les expériences de mutagenèse dirigée sont réalisées conformément aux instructions fournies dans le kit GeneTailor Site-directed Mutagenesis System (Invitrogen).

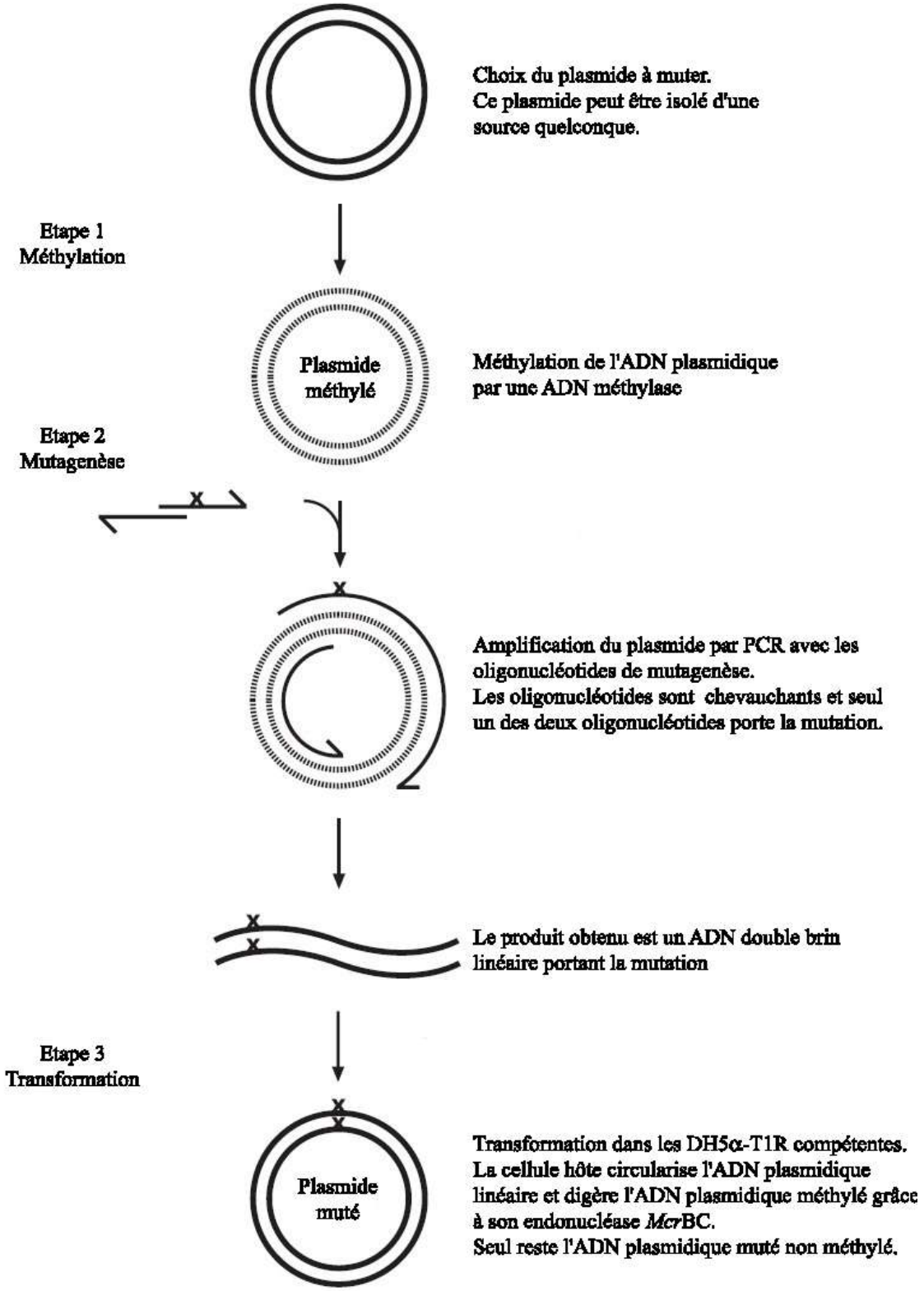


Figure 33 : Principe de la mutagenèse dirigée GeneTailor (GeneTailor site directed mutagenesis, INVITROGEN).

Le principe de la méthode GeneTailor présenté sur la figure 33 repose sur une réaction de méthylation utilisant une ADN méthylase, la SAM (S-adénosyl méthyltransférase), qui va méthyler toutes les cytosines des sites CG du plasmide, suivie de la réalisation d'une PCR utilisant une ADN polymérase hautement fidèle et processive, l'ADN polymérase *Pfu Ultra* (Stratagene). Le plasmide est dans un premier temps méthylé à l'aide de la SAM 1 h à 37 °C. L'ADN polymérase *Pfu Ultra* permet ensuite de synthétiser le brin complémentaire au plasmide parental dénaturé à partir de l'oligonucléotide portant la mutation. Le produit de PCR sera donc formé majoritairement de plasmide non méthylé hébergeant le gène muté et de quelques exemplaires du plasmide parental méthylé. Ces derniers sont les cibles de l'endonucléase *Mcr*BC et sont éliminés sélectivement par la souche de bactérie d'*E. coli* DH5α-T1^{R} (Invitrogen) que nous utilisons pour la transformation.

Un élément primordial pour la réussite d'une réaction de mutagenèse est la mise au point des oligonucléotides. Celle-ci repose sur quatre critères majeurs :

- la longueur de chacun des oligonucléotides (sens et reverse) doit être approximativement de 30 nucléotides, sans compter la mutation sur l'oligonucléotide muté ;
- les oligonucléotides doivent avoir une région chevauchante de 15 à 20 nucléotides à leur extrémité 5' afin de permettre une circularisation efficace des produits de PCR ;
- le site de mutation doit se trouver impérativement sur un seul oligonucléotide en aval et adjacent à la région chevauchante, et peut faire jusqu'à 21 bases (insertions, délétions et/ou substitutions) ;
- l'oligonucléotide doit comporter au moins 10 nucléotides en aval de la mutation afin de permettre une hybridation efficace lors de la PCR.

Les oligonucléotides contrôles fournis dans le kit est un exemple possible de design d'oligonucléotides. Les oligonucléotides contrôles sont les suivants (la mutation peut être située sur l'un ou l'autre oligonucléotide ; en gras, le site de mutation) :

Oligonucléotide sens 5'GACCATGATTACGCCAAGCT**tAt**AAATTAACCCT3'

Oligonucléotide reverse 3' TTTGTCGATACTGGTACTAATGCGGTTCGA5'

La PCR de mutagenèse est effectuée selon les paramètres indiqués dans le tableau 17 dans un thermocycleur (PTC-100, MJResearch, Inc.). Pour une efficacité optimale, le nombre de cycle recommandé est 20 ; augmenter le nombre de cycle permet d'avoir un meilleur rendement mais ne permet pas une mutagenèse plus efficace.

Température	Temps	Nombre de cycles
94 °C	2 min	1
94 °C	30 s	
55 °C	30 s	20
68 °C	1 min / kb du plasmide	
68 °C	10 min	1

Tableau 17 : Caractéristiques des cycles PCR.

8. Extraction d'ADN à partir d'un gel d'agarose et purification.

Les produits d'amplification PCR ou de digestion de restriction sont purifiés selon le protocole du kit « QIAquick Gel Extraction » (QIAGEN) puis dosés par spectrophotométrie (cf § X). Pour cela, les produits sont mis à migrer sur un gel d'agarose à 0,8 % (agarose Seakem GTG, Eurobio) selon la méthode décrite au § **II - 10**. Les bandes visualisées sous UV sur un transilluminateur (BIOBLOCK Scientific, France) sont découpées à l'aide d'un scalpel puis on procède à leur purification.

9. Reverse transcription (RT) et amplification par PCR.

La transcription inverse permet de transcrire un ARNm en son ADN complémentaire (ADNc) à l'aide de la transcriptase inverse. Cette enzyme a pour substrat les ARN à partir desquels elle synthétise un brin complémentaire d'ADN, grâce à un pool d'amorces hexamériques aléatoires s'hybridant sur les séquences d'ARNm. Cette technique est réalisée en utilisant le kit « Superscript II» (Invitrogen). Elle permet d'obtenir et d'amplifier la séquence codante des gènes.

Dans un premier temps, 1 µg d'ARN total est incubé avec 1 µl d'un mélange à 10 mM de chaque dATP, dGTP, dCTP et dTTP, 1 µl d'amorces hexamériques à 100 µM (ou 2 pmoles de chacune des amorces spécifiques d'un ADNc) dans un volume réactionnel de 12 µl pendant 5 min à 65 °C dans un thermo-bloc chauffant. Le mélange est ensuite refroidi dans la glace puis pré-incubé 2 min à 42 °C avec le tampon de la transcriptase (tampon de transcription « First Strand » 1 x), 10 mM de DTT et 40 U de RNasin (Invitrogen). La synthèse de l'ADNc est effectuée à 42 °C

pendant 50 min en présence de 200 U de transcriptase inverse qui est ensuite inactivée par une incubation de 15 min à 70 °C. Enfin la matrice d'ARN est éliminée par l'action de 2 U de RNase H d'*E. coli*, 20 min à 37 °C.

On procède ensuite à une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) afin d'amplifier une séquence spécifique d'ADN présente en faible quantité.

L'ADNc monocaténaire obtenu à l'issue de la RT est amplifié par PCR. Deux µl de produit de RT sont incubés avec 2 U d'ADN polymérase de *Thermus aquaticus* (Taq Platinum, Invitrogen) en présence de tampon 1 x [20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl], de 1,5 mM de $MgCl_2$, 200 µM de dNTP et 0,2 µM de chacune des amorces dans un volume réactionnel de 50 µl.

L'amplification est effectuée dans un thermocycleur (PTC-100, MJResearch, Inc.) et comporte les étapes suivantes (tableau 18) :

Phase	**Durée et température**	**Nombre de cycles**
Dénaturation	2 min à 94 °C	1
Dénaturation Hybridation Extension	1 min à 94 °C 1 min à (Tm – 5) °C 1 min à 72 °C	20 à 30
Extension	10 min à 72 °C	1

Tableau 18 : Programme PCR pour amplification après la RT. Tm correspond à la moyenne des températures de fusion des amorces.

La PCR est une méthode d'amplification sensible ; plusieurs contrôles sont inclus lors des réactions afin de s'assurer de l'absence de contamination des échantillons par de l'ADN exogène :

- un contrôle négatif de PCR, obtenu par réaction avec les amorces spécifiques du gène d'intérêt et un ARN contrôle.
- un contrôle positif obtenu par réaction d'un ARN contrôle avec ses amorces spécifiques.

Les produits de l'amplification sont déposés sur gel d'agarose 0,8 à 1 % afin de vérifier leur taille. Ils sont éventuellement purifiés selon le protocole du kit « QIAquick Gel extraction » (QIAGEN) puis dosés par spectrophotométrie.

10. Electrophorèse en gel d'agarose.

Les ARN, les produits de PCR ou les produits de digestion de restriction dilués dans du tampon échantillon 6 x (xylène cyanol FF 0,25 %, bleu de bromophénol 0,25 %, glycérol 30 %, eau distillée 70 %) sont séparés par une électrophorèse en gel d'agarose (concentration d'agarose variable en fonction de la taille du produit à séparer) dans du tampon TAE (Tris-acétate 40 mM, EDTA 1 mM) et en présence de bromure d'éthidium (BET) 0,5 mg/ml.

11. Digestion de restriction.

Les plasmides et les inserts destinés au clonage sont digérés par les enzymes de restriction appropriées, selon les recommandations du fournisseur (New England BioLabs) dans un volume réactionnel de 10 à 20 µl. Les produits de digestion sont analysés sur gel d'agarose (§ **II - 10**) et sont éventuellement purifiés (§ **II - 8**).

12. Ligation

Pour les ligations, 50-100 ng de vecteur et 3 fois plus de molécules d'insert sont dilués et chauffés à 50 °C pour cinq minutes. Le mélange est laissé à la température de la pièce cinq minutes puis le tampon commercial et l'ADN ligase sont ajoutés pour compléter le volume à 20 µl. Pour une ligation rapide, 400 U de ligase concentrée (New England BioLabs) sont utilisées et le mélange est incubé à température pièce 10 minutes (et, dans certains cas, 10 minutes supplémentaires à 16 °C). Alternativement, 40 U de ligase sont utilisées et l'incubation s'est poursuivie une nuit à 16 °C. Par la suite, 10-20 µl du produit est utilisé pour la transformation de 100 µl de cellules *E. coli* chimiocompétentes (voir § **II - 2**).

Pour les clonages dans pGEM-T Easy (Promega) ou pCR II-TOPO (Invitrogen), nous suivons les recommandations des fournisseurs.

13. Clonage : la technologie Gateway.

Dans la majorité des cas, le clonage est réalisé grâce à une technologie standardisée : la technologie GATEWAY commercialisée par la société Invitrogen. Celle-ci met en jeu des transferts d'ADN entre différents vecteurs grâce à des recombinaisons sites spécifiques. Cette technologie s'inspire du processus naturel d'intégration/excision du phage lambda dans/du génome d'*Escherichia coli* (figure 34). Les sites naturels de recombinaisons attB, L, R et P ont été modifiés de façon à augmenter l'efficacité de recombinaison et à permettre le clonage directionnel.

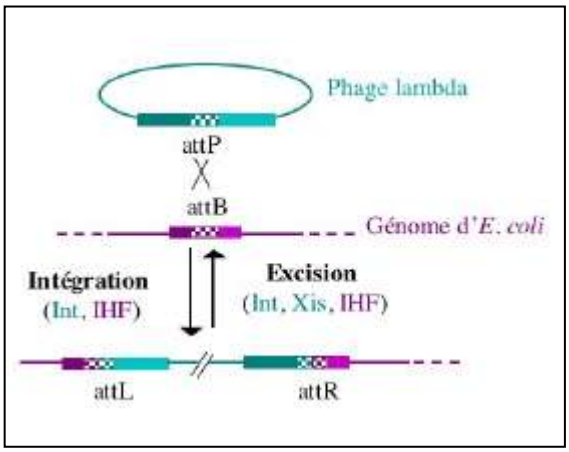


Figure 34 : Figure x : Réactions de recombinaisons entre le phage lambda et *E. coli*. La réaction attP x attB (intégration) est catalysée par les enzymes Int (intégrase), et IHF (factor d'intégration). Une enzyme supplémentaire, l'excisionase (Xis) intervient dans la réaction d'excision attL x attR. Int, Xis sont codées par le génome du phage, alors que IHF est une protéine d'*E. coli*.

13. 1. Première étape : réaction de PCR.

La première étape consiste à obtenir l'ORF à cloner avec, à chacune de ses extrémités, deux sites de recombinaison attB : attB1 et attB2. Ces deux sites sont légèrement différents l'un de l'autre, ce qui permet d'assurer tout au long du processus un clonage directionnel. Cette opération est réalisée par une réaction de PCR utilisant un couple d'amorces oligonucléotidiques dont les extrémités 5' sont constituées par les séquences attB1 et attB2.

13. 2. Réaction BP.

Il s'agit lors de la deuxième étape de sous cloner le produit de PCR obtenu par une première réaction de recombinaison (BP réaction, figure 35). On obtient alors un «clone d'entrée» dans lequel l'ORF est maintenant flanquée de deux sites attL : attL1 et attL2.

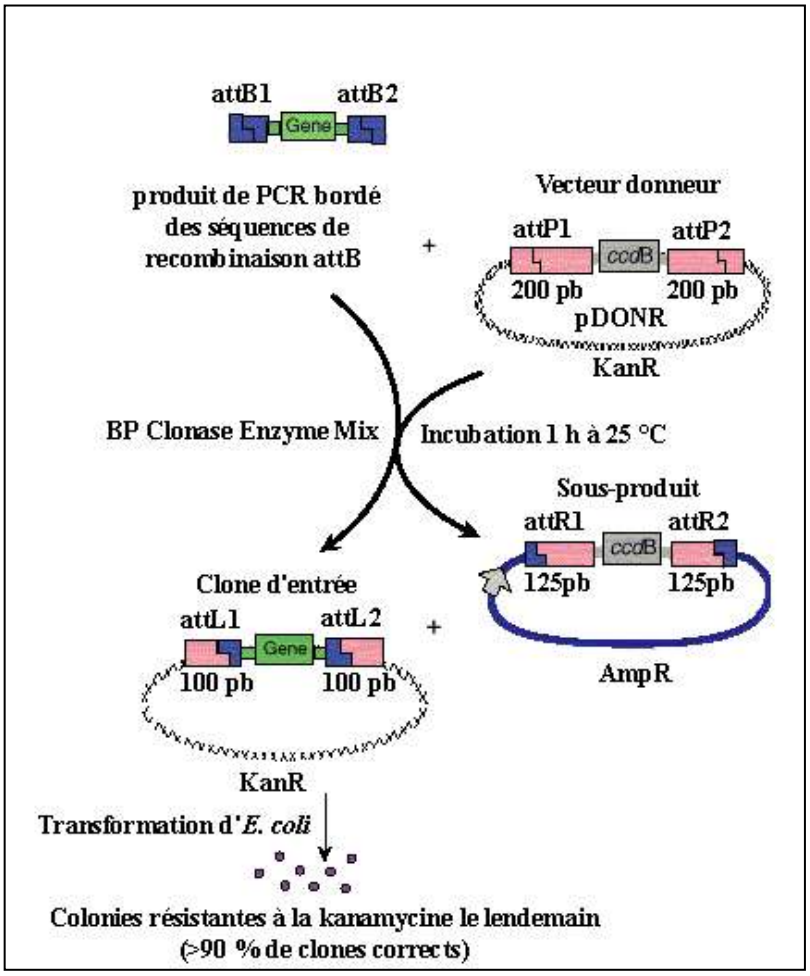


Figure 35 : BP réaction.

13. 3. Réaction LR.

La troisième étape (LR réaction, figure 36) est une incubation, sans purification du clone d'entrée, avec le «vecteur de destination» (par exemple pDEST 12.2 ou pDEST 17). Ce vecteur d'expression est muni des sites attR1 et attR2 recombinant spécifiquement avec les sites attL1 et attL2, permettant ainsi l'obtention d'un «clone d'expression». Le produit de cette seconde et

dernière étape est utilisé pour transformer la souche bactérienne d'intérêt (XL-1 Blue ou DH5α pour amplification ; BL21 pour expression hétérologue…).

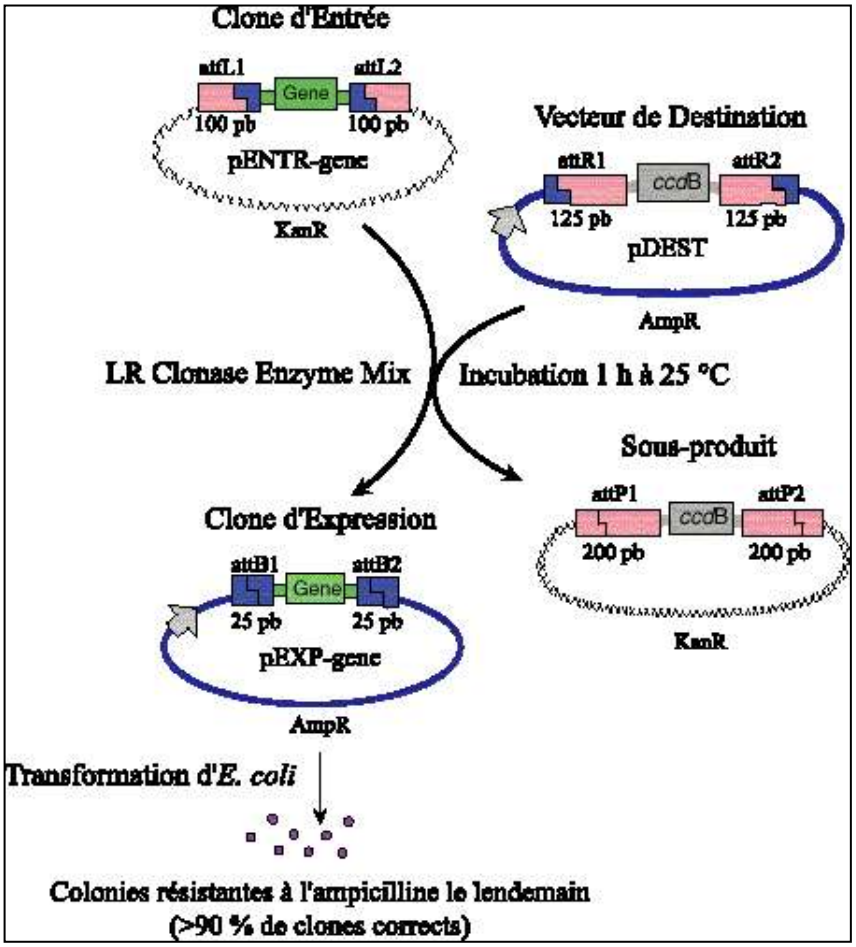


Figure 36 : LR réaction.

III. METHODES DE BIOLOGIE CELLULAIRE.

1. Milieux et conditions de culture cellulaire.

L'ensemble des expériences présentées est réalisée sur les cellules adhérentes HeLa (cellules épithéliales humaines issues d'un carcinome du col de l'utérus) et les cellules Du145 (cellules épithéliales humaines issues d'un carcinome de prostate).

Les lignées cellulaires sont cultivées à 37 °C en atmosphère humide enrichie en CO_2 (95 % d'air, 5 % de CO_2) dans des boîtes de culture de 100 mm^2 (Falcon). Les milieux de cultures sont changés tous les 2 à 3 jours. Les cellules sont passées environ une fois par semaine. Pour cela, le milieu est retiré et conservé, les cellules sont lavées avec 5 ml de PBS, puis 3 ml de trypsine (GibcoBRL) sont ajoutés directement sur les cellules. Après 5 min d'incubation à 37°C, on décolle les dernières cellules adhérentes par tapotement mécanique sur la boîte de culture. La trypsine est bloquée par rajout du milieu de culture précédemment retiré. La suspension de cellules est centrifugée 5 min à 800 g. Le culot de cellules est resuspendu dans 10 ml de milieu frais préchauffé à 37 °C. Les cellules sont repiquées en général au $1/20^e$ (5×10^4 cellules/boîte).
Les cellules HeLa sont cultivées dans le milieu RPMI 1640 (Sigma) additionné de 10 % de sérum de veau fœtal (Eurobio) préalablement décomplémenté 30 min à 56 °C, de l'anti-PPLO 1 x (GibcoBRL), de L-glutamine (2 mM) (GibcoBRL), de pénicilline (100 U/ml) et de streptomycine (100 µg/ml) (GibcoBRL).
Les cellules Du145 sont cultivées dans le Milieu de Eagle Modifié par Dulbecco (D-MEM) (Sigma) contenant entre autres 4500 mg/l de glucose et additionné de 10 % de sérum de veau fœtal préalablement décomplémenté 30 min à 56 °C, de l'anti-PPLO 1 x (GibcoBRL), de L-glutamine (2 mM) (GibcoBRL), de pénicilline (100 U/ml) et de streptomycine (100 µg/ml) (GibcoBRL).
Les cellules sont régulièrement contrôlées pour l'absence de mycoplasme par une coloration au Hoechst.
Les cellules sont conservées dans des ampoules en azote liquide dans leur milieu de culture respectif additionné de DMSO (10 % final) pour éviter tout biais clonal.

2. Transfection stable.

2. 1. Electroporation.

Elle permet l'introduction de gènes dans les cellules sous l'influence d'une brève décharge électrique (Kaplan et Delpech, 1992). L'application d'un champ électrique à haute tension au niveau de cellules en culture provoque l'ouverture transitoire de pores dans la membrane

cellulaire et crée une force électrophorétique qui permet à l'ADN chargé négativement d'entrer dans la cellule.

Cette méthode est utilisée pour la transfection des cellules HeLa ou Du145 par le plasmide d'intérêt. Le principe de l'électroporation est de soumettre les cellules en suspension à un champ électrique durant une courte période ou « pulse ». Le champ électrique conduit à la formation transitoire de pores membranaires au niveau desquels les plasmides peuvent pénétrer dans la cellule.

Les cellules en phase exponentielle de croissance sont trypsinisées et comptées. Dans une cuve à électroporation (BIO-RAD), on dépose : 10 µg d'ADN plasmidique, et 1 ml de suspension cellulaire à 1. 10^6 cellules/ml (milieu de culture sans sérum). Le mélange est homogénéisé et la suspension est ensuite soumise à un choc électrique de 250 V, d'intensité 250 µF pendant deux pulses (électroporateur Gene Pulser II, BIO-RAD). Les cellules sont alors transférées dans une boîte de culture 100 mm de diamètre contenant du milieu complet et sont incubées 24 h à 37 °C, avec 5 % de CO_2. Les cellules sont soumises à une sélection stable à la néomycine (Invitrogen) (250 µg/ml) pendant 1 à 2 semaines (les plasmides utilisés au cours de ma thèse portent tous un gène de résistance à la néomycine).

2. 2. Lipofection.

Les cellules HeLa ou Du145 sont transfectées par lipofection (lipofectamine 2000, Invitrogen) avec 10 µg de plasmide. Les cellules à transfecter sont ensemencées en boîte de culture 100 mm de diamètre de manière à avoir 50 – 70 % de confluence au bout de 24 h. Après un temps d'adhésion de 24 h le milieu de culture est aspiré et les cellules lavées trois fois avec du milieu Optimem I (GibcoBRL) sans sérum. Dix µg de plasmide sont repris dans 100 µl de milieu Optimem I et mélangés à 25 µl de lipofectamine 2000. Ce mélange est incubé 15 min à température ambiante puis repris avec 5 ml de milieu Optimem I avant de dispenser aux cellules. Les cellules sont placées 24 h dans l'incubateur à 37 °C, 5 % de CO_2. Au terme de cette incubation, le milieu de transfection est aspiré et du milieu de culture complet est ajouté dans chaque boîte. Après 24 h d'incubation à 37 °C dans du milieu de culture, les cellules sont soumises à une sélection stable à la néomycine (250 µg/ml) pendant 1 à 2 semaines (les plasmides utilisés au cours de ma thèse portent tous un gène de résistance à la néomycine).

3. Induction de l'apoptose de cellules *in vitro* par des agents physico-chimiques.

Lorsque les cellules sont à 75 à 80 % de confluence, du milieu frais est ajouté et l'apoptose peut être induite par différents traitements : étoposide (50 µg/ml + x h de traitement), ou irradiation par les U.V. (1 min + x h après irradiation). Après chaque traitement, les cellules ont les caractéristiques morphologiques typiques de l'apoptose comme le bourgeonnement de la membrane plasmique et la condensation de la chromatine en périphérie du noyau qui est visible en microscope à fluorescence par une coloration de l'ADN avec un agent intercalent, le Hoechst (Juin *et al.*, 1998).

4. Dénombrement des cellules non viables au bleu de trypan.

Le bleu de trypan fait partie des différents colorants d'exclusion utilisés pour la numération des cellules viables selon la propriété des cellules vivantes à ne pas internaliser certains colorants par l'action de leur barrière cytoplasmique active contrairement aux cellules mortes. Ce principe appliqué à ce colorant permet la différenciation des cellules viables (incolores) et non viables (colorées en bleu) lors de la numération cellulaire. La suspension cellulaire homogénéisée est diluée au 1/100^{e} dans du PBS. 90 µl de cette suspension est transférée dans une plaque 96 puits et est mélangée à 10 µl de bleu de trypan 0,4 % (Eurobio). Le mélange est incubé 5 min puis une fraction est déposée dans une chambre d'hémocytomètre (cellule type Mallassez avec lamelle de verre). On procède ensuite au comptage, à l'aide d'un microscope avec un objectif oculaire 10 x, des cellules viables (réfringentes) et les cellules non viables.

5. Microinjection

Les cellules sont mises en culture dans des lamelles stériles (préalablement traîtées avec de la gélatine 0,1 %/PBS pendant 1/2 h) un jour avant la microinjection dans leur milieu de culture habituel. La microinjection est réalisée à l'aide du micromanipulateur InjectMan NI2 et d'un injecteur FemtoJet (Eppendorf, Allemagne). Pour toutes les expériences, nous appliquons les mêmes conditions de pression (100 hPa) et de temps (0,1 s). Les plasmides sont dilués dans du PBS avec le plasmide pDsRed2-C1 (Clontech) comme marqueur de co-injection. Généralement,

100 cellules sont microinjectées pour chaque expérience. Le pourcentage de cellules positives (c'est-à-dire montrant une fluorescence rouge) avec les caractères morphologiques caractéristiques de l'apoptose est ensuite évalué.

6. Microscopie confocale.

Les cellules sont mises en culture sur des lamelles de verre stériles traitées à la gélatine 0,1%/PBS. Les cellules sont alors fixées avec du paraformaldéhyde 4 %/acide picrique 0,19%/PBS pendant 15-30 min à température ambiante. Après cette fixation et entre chacune des étapes suivantes, les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS. Les cellules sont perméabilisées avec du SDS 0,1 %/PBS pendant 10-15 min. Après saturation à la BSA 3 % / PBS pendant 30 min, les anticorps primaires, dilués dans la BSA 1 % / PBS (voir tableau x), sont déposés et incubés chacun 1 h à température ambiante. Les anticorps secondaires (voir tableau x), également dilués dans la BSA 1 % / PBS, sont mis à incuber chacun 1 h à température ambiante à l'abri de la lumière. Alternativement, la saturation peut être réalisée avec de la gélatine 5 % / PBS et la dilution des anticorps avec de la gélatine 1 % / PBS. Après plusieurs lavages, les lamelles sont montées sur lame de verre au Mowiol. Les images sont analysées à l'aide d'un microscope confocal Leica TCS NT avec un objectif 63 x 1,3 NA Fluotar (Leica, France).

7. Extraction des protéines cellulaires totales

Les cellules récupérées par trypsinisation ou par grattage des boîtes de culture sont centrifugées (1000 g, 10 min, à 4 °C) et lavées deux fois avec du PBS. Les culots cellulaires sont resuspendus vol/vol dans du tampon RIPA [Na-Deoxycholate 0,5 %, Nonidet P40 1 %, SDS 0,1 %, Na-Vanadate 1 mM, dans du PBS, additionné d'une tablette d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Mini, Roche) pour 10 ml]. Les échantillons sont homogénéisés par pipetages successifs, incubés 30 min sur glace puis broyées à l'aide d'un piston en plastique. Les homogénats sont ensuite centrifugés à 15 000 g à 4 °C pendant 20 min, et le surnageant contenant les protéines cellulaires totales est récupéré. Les protéines contenues dans les échantillons sont dosées par la méthode Bradford (1976) en mesurant la DO à 595 nm (voir § **III - 8**).

8. Dosage des protéines.

La concentration protéique est déterminée par la méthode de Bradford (Bio-Rad's protein assay, Bio-Rad), par lecture de l'absorbance à 595 nm.

9. Fractionnement cellulaire

9. 1. Fractionnement pour l'obtention des fractions mitochondriales et cytosoliques.

Pour l'étude de la localisation sub-cellulaire des protéines d'intérêt, les extraits cytosoliques de cellules contrôles ou induites en apoptose ont été préparées après x h d'un traitement x. Dans le cas des cellules adhérentes, on prélève le surnageant qui contient principalement des corps apoptotiques et des cellules à un stade avancé de l'apoptose et celles qui adhèrent encore au plastique (cellules à un stade plus précoce de l'apoptose) à l'aide d'un grattoir. Les cellules sont récupérées ainsi à différents temps après induction de l'apoptose et centrifugées à 800 g (cellules contrôles) ou à 1 000 g (cellules apoptotiques) pendant 10 min à 4°C. Les cellules sont lavées deux fois dans du PBS 1 x (Phosphate Buffer saline : $NaPO_4$ 150 mM, pH 7,2, NaCl 180mM) et resuspendues volume à volume dans un tampon CEB (Cell Extract Buffer) (saccharose 250 mM, HEPES 50 mM pH 7,4, KCl 50 mM, $MgCl_2$ 2 mM, dithiothreitol (DTT) 1 mM, cytochalasine B 10 µM, supplémenté en EGTA 1 mM et PMSF 1 mM) identique à celui du culot cellulaire. Les cellules sont fragilisées par un choc hypotonique sur glace pendant 30 min puis lysées dans un potter en verre de 2 ml (Kontes gloss co. DUALL 20) avec un piston en verre en faisant 20 allers-retours. L'homogénat est alors transféré dans un tube de 1,5 ml puis centrifugé à 750 g pendant 10 min à 4 °C pour éliminer les débris des membranes cellulaires et les noyaux. Le surnageant est alors centrifugé à 13 000 g pendant 20 min à 4 °C pour obtenir la fraction mitochondriale (Mito). Cette dernière est reprise dans un volume minimum de CEB (20-50 µl). Le surnageant est à nouveau centrifugé à 100 000 g pendant 30 min (Airfuge, Beckman, U.S.A.) pour sédimenter les microsomes. Le surnageant qui en résulte correspond à ce que l'on appelle fraction cytosolique

ou S100. Les protéines de ces deux fractions (S100 et Mito) sont dosées par la méthode de Bradford puis conservés à – 80 °C.

La quantité de protéine Bax ou Bax mutée associée à la fraction mitochondriale (50 µg) dans cette lignée humaine avant et après induction de l'apoptose, et résistance au traitement alcalin (incubation 30 min sur glace) a été déterminé par western blot. Pour les traitements alcalins, les mitochondries isolées par centrifugation après 1 h d'incubation à 30 °C sont resuspendues dans 100 µl de tampon carbonate de sodium (saccharose 0,3 M, Na_2CO_3 0,1 M, pH 11,5) et laissées 30 min sur glace. La réaction est centrifugée à nouveau et le culot est déposé sur gel SDS-PAGE.

Parallèlement, des niveaux identiques de Bax présents dans les fractions S100 prélevées à différents temps après induction de l'apoptose ont été incubés à 30 °C pendant 1 h avec 50 µg de mitochondries purifiées à partir de foie de rate BD IX. Après centrifugation, l'association de Bax et des mutants de Bax à ces organites a été révélée par western blot.

9. 2. Fractionnement pour l'obtention des protéines mitochondriales.

Cette méthode permet d'obtenir par des centrifugations différentielles une fraction fortement enrichie en mitochondries. Les cellules sont récupérées à différents temps après induction de l'apoptose et centrifugées à 800 g (cellules contrôles) ou à 1 000 g (cellules apoptotiques) pendant 10 min à 4 °C. Les culots cellulaires sont rincés deux fois dans du PBS 1x et centrifugés entre chaque rinçage à 800 g (cellules contrôles) ou 1 000 g (cellules apoptotiques), 10 min à 4 °C. Ils sont ensuite repris dans un tampon MIB (Mitochondria Extraction Buffer) (210 mM mannitol, 60 mM sucrose, 10 mM Na-succinate, 20 mM HEPES pH 7,5, 10 mM KCl, 5 mM EGTA, 0,5 mM DTT, 1 mM ADP, 1 tablette de cocktail d'inhibiteurs de protéases) et laissés 30 min sur glace. Les cellules sont ensuite cassées dans un potter en verre (20 allers-retours) puis centrifugées à 300 g pendant 10 min à 4 °C. Le surnageant obtenu contenant les mitochondries et le cytosol est centrifugé à 5 500 g, 10 min à 4 °C. Les mitochondries contenues dans le culot sont reprises dans un volume minimum de MIB (20-50 µl), dosées par la méthode Bradford et stockées à – 80 °C.

10. Purification de mitochondries à partir d'organes sains isolés.

Les mitochondries sont purifiés à partir de foie de rate BDIX par ultracentrifugation successives réalisées dans des tampons d'homogéinisation permettant de conserver les propriétés biochimiques de ces organites. Les mitochondries sont fraîchement purifiées à l'aide d'un premier tampon (saccharose 0,3 M, HEPES 10 mM) puis d'un second (mannitol 0,3 M, MOPS 5 mM, pH 7,2) selon le protocole décrit par Chich (1991) à l'exception qu'un gradient de Percoll est ajouté pour séparer les mitochondries d'éventuels contaminants comme les lysosomes. Les mitochondries sont reprises dans le second tampon et un dosage protéique est effectué par la méthode Bradford au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595 nm. La concentration protéique est ajustée à 10 mg/ml et, de par leur fragilité, les mitochondries sont rapidement utilisées. La fonctionnalité de ces organites est testée en contrôlant l'importation de protéines dans ces composants intracellulaires.

11. Synthèse *in vitro* de protéines.

Les protéines radio-marquées sont synthétisées *in vitro* avec le système TNT couplant la transcription et la traduction (Promega, France) conformément aux instructions du fournisseur, en présence d'ARN polymérase (T7, SP6 ou T3), de lysat de réticulocytes de lapin dépourvu de nucléases (mélange de facteurs d'initiation, d'élongation et de terminaison, d'ARNt et d'ARNr), d'un mélange d'acides aminés et de méthionine-^{35}S (Amersham, France). Avant chaque expérience d'association post-traductionnelle avec les organites, la quantité de protéine radio-marquée ajoutée (quantité initiale) est estimée à partir de la quantité de méthionine-^{35}S incorporée dans la protéine après la synthèse *in vitro* en réalisant une précipitation au TCA (acide trichloroacétique) (méthode du fournisseur Promega).

12. Association dans un système acellulaire des protéines de la famille Bcl-2.

Les protéines radio-marquées à la méthionine-^{35}S sont mises en présence de 100 µg de mitochondries dans du tampon TRB 1X (sucrose 250 mM, KCl 80 mM, acide malique 10 mM, acide succinique 8 mM, ATP-Mg2+ 1mM, MOPS 20 mM pH7,5) supplémenté en lysat de

réticulocytes de lapin 25 % pour un volume final de 40 µl. Après 1 h d'incubation à 30°C, les mitochondries sont centrifugées 10 min à 8000 g à 4 °C. Les culots et les surnageants obtenus sont repris dans du tampon protéique réducteur (Tris-HCl 62 mM, glycérol 10 %, SDS 2 %, β-mercaptoéthanol 5 %, bleu de bromophénol 0,01 %) et chauffés à 100 °C pendant 5 min.

Les protéines radio-marquées associées (ou non) aux mitochondries sont analysées sur gel SDS-PAGE à 12 ou 15 %. La migration du gel se fait dans le tampon d'électrophorèse à un voltage constant de 200 V jusqu'à la sortie du bleu de bromophénol. Une coloration au bleu de Coomassie (méthanol 40 %, acide acétique 10 %, bleu de Coomassie 0,1 %) puis une décoloration dans un mélange méthanol 40 % / acide acétique 10 % permet de visualiser et de fixer les protéines. Le gel est réhydraté dans un mélange méthanol 20 % / glycérol 3 %, séché 1 h sur un sécheur de gel (Slab Gel Dryer SGD4050, SAVANT), mis à exposer en cassette (Storage Phosphor Screen, Molecular Dynamics) pendant au moins 2 semaines, puis scanné au PhosphorImager (Molecular Dynamics, France). La quantité de protéines radio-marquées présente dans le gel est déterminée à l'aide du logiciel IPLab Gel Programm (Signal Analytics, Vienne, USA).

Nous avons utilisé ce protocole dans toutes les expériences d'association des protéines aux mitochondries. Nous l'avons éventuellement adapté pour étudier l'effet de la température, d'un traitement alcalin ou de tBid sur l'insertion des protéines de la famille Bcl-2 dans les membranes.

Les protéines radiomarquées associées aux mitochondries après centrifugation sont analysées sur gel SDS-PAGE et visualisées comme précédemment décrit.

13. Pontage moléculaire ou Crosslinking.

Pour les expériences de pontage avec le DMA (Dimethyl adipimidate), le DMS (Dimethyl suberimidate), l'EGS [Ethylene glycolbis(succinimidylsuccinate)] ou le DSS (Disuccinimidyl suberate), la fraction mitochondriale (MITO) est resuspendue et la fraction cytosolique (S100) est diluée dans du CEB de manière à avoir une concentration protéique de 2 mg/ml. Ces suspensions sont ensuite incubées en absence ou en présence de 2 ou 5 mM d'agent pontant pendant 45 minutes à température ambiante. Les réactions sont quenchées par addition de Tris-HCl (pH 7,5) à 25 mM final. L'oligomérisation de Bax est analysée par immunoblot après un gel SDS-PAGE 12 %.

14. Immunoprécipitation.

Les expériences d'immunoprécipitation sont réalisées avec le kit « Catch and Release v2.0 Reversible Immunoprecipitation System » (Upstate) en suivant les recommandations du fournisseur.

15. Gels bidimensionnels (2D).

Cette technique permet d'analyser la masse moléculaire et l'oligomérisation de complexes protéiques par électrophorèse en condition native et permet l'isolation de complexes protéiques membranaires par électrophorèse bidimensionnelle.

15. 1. Préparation des échantillons.

Les mitochondries sont centrifugées 10 min à 16 000 g à 4°C pour obtenir un culot que l'on resuspend dans un tampon 50 mM NaCl, 5 mM acide 6-aminohexanoique, 50 mM imidazole, pH 7, dans un volume adéquat pour obtenir une solution à 10 mg/ml de protéines. La digitonine 10 % (w/v) purifiée (digitonine recristallisée deux fois dans l'éthanol absolu à 75 °C) est ensuite ajoutée de manière à avoir un ratio r = mg digitonine/mg protéines = 3. Après une incubation de 30 min sur glace, le mélange est centrifugé à 16 000 g à 4°C et le surnageant est récupéré. Le bleu de Coomassie (bleu de Coomassie G250 5 % (w/v) dans 500mM acide 6-aminohexanoique) est ajouté à l'échantillon de manière à avoir un ratio r = mg digitonine/mg bleu de Coomassie = 4.

15. 2. BN-PAGE (1ère dimension).

Les échantillons sont ensuite déposés sur un gel natif coulé en gradient 5-14 %. La migration (de la cathode vers l'anode) est effectuée sur la nuit à 10 mA et 120 V. La composition des gels de

séparation et de concentration ainsi que des tampons de migration cathodiques et anodiques sont décrits ci-dessous :

Gel de séparation (gradient 5-14 %) :

- Solution 5 % : 2,9 ml acryl-bisacrylamide (30 % T, 3 % C), 5,8 ml solution gel 3 X (75 mM imidazole, 1,5 mM acide 6-aminohexanoique, pH 7), 175 µl APS 10 % (v/v), 7 µl TEMED, H_2O distillée qsp 17,5 ml.
- Solution 15 % : 8,2 ml acryl-bisacrylamide (30 % T, 3 % C), 5,8 ml solution gel 3 X (75 mM imidazole, 1,5 mM acide 6-aminohexanoique, pH 7), 2,9 ml glycérol 87 %, 175 µl APS 10 % (v/v), 7 µl TEMED, H_2O distillée qsp 17,5 ml.

Gel de concentration 4 % : 0,8 ml acryl-bisacrylamide (30 % T, 3 % C), 2 ml solution gel 3 X (75 mM imidazole, 1,5 mM acide 6-aminohexanoique, pH 7), 60 µl APS 10 % (v/v), 6 µl TEMED, H_2O distillée qsp 6 ml.

Tampon cathodique : 50 mM tricine, 7,5 mM imidazole, 0,002 % (w/v) bleu de Coomassie G250, pH 7.

Tampon anodique : 25 mM imidazole, pH 7.

15. 3. SDS-PAGE (2nde dimension).

Les pistes de BN-PAGE sont découpées et peuvent être conservées à – 80 °C. Chaque piste est incubée 2 h à température ambiante sous agitation dans un bain SDS 1% (w/v), β-mercaptoéthanol 1 % (v/v) puis rincées au moins 3 fois 10 min dans de l'eau distillée. Le montage pour la seconde dimension est ensuite réalisé en plaçant la piste en position d'un gel de concentration en laissant un petit espace pour permettre de couler le gel de séparation (gel de résolution SDS-PAGE classique 12 %) puis le gel de concentration (gel de concentration SDS-PAGE classique 4 %). Le gel de concentration 4 % est coulé autour de la piste de BN-PAGE en créant un puit pour le marqueur de poids moléculaire. La suite des opérations est la même que le protocole pour les western-blots (cf § **III – 17**).

16. Gel SDS-PAGE

Les protéines solubilisées par du SDS sont dénaturées et sont globalement chargées négativement. Ainsi, les protéines peuvent être séparées par électrophorèse en conditions dénaturantes sur gel de polyacrylamide en fonction uniquement de leur taille. La méthode utilisée au laboratoire est celle décrite par Laemmli (1970). Le maillage du gel est choisi en fonction de la taille des protéines à séparer (tableau 19).

Concentration d'acrylamide* (%)	Gamme de séparation (kD)
15	12-43
10	16-68
7,5	36-94
5	57-212

Tableau 19 : Gamme de séparation des gels SDS-PAGE. * Le ratio molaire bisacrylamide/acrylamide est de 1:29

16. 1. Préparation des échantillons.

Les échantillons protéiques sont dilués ½ dans du tampon échantillon 2 x (Tris-HCl 90 mM, pH 6,8 ; SDS 2 %, glycérol 20 %, bleu de bromophénol 0,02 %) additionné de β-mercaptoéthanol (0,1 M). Les protéines sont dénaturées soit par chauffage à 100 °C durant 5 min soit en les laissant toute la nuit à température ambiante, et séparées par migration en SDS-PAGE.

16. 2. Electrophorèse.

Des aliquotes de protéines (50 µg) sont déposées sur un gel de polyacrylamide constitué d'un gel de résolution de 10 à 15 % et d'un gel de concentration à 5 % d'acrylamide/bisacrylamide. L'électrophorèse des protéines est généralement effectuée à 200 V dans le tampon de migration (Tris base 0,1 M, Glycine 384 mM, SDS 0,1 %). Des standards protéiques de masse moléculaire connue (BIO-RAD) sont également déposés afin d'étalonner la migration des protéines et d'estimer leur masse moléculaire.

17. Western-blot.

17. 1. Electrotransfert.

17. 1. 1. Transfert semi-sec.

Le gel est utilisé pour un électrotransfert des protéines sur membrane en PVDF (PolyVinylidine DiFluoride) Immobilon-P (Millipore, France) dans l'appareil à transfert semi-sec (Large semi-dry blotter, APELEX ou Trans-Blot 3D, BIO-RAD). La membrane en PVDF est rendue hydrophile par immersion dans du méthanol pur (30s). En fin d'électrophorèse, la membrane, les feuilles de papier Whatman et le gel sont équilibrés pendant 15 min dans le tampon de transfert (Tris base 25 mM, Glycine 150 mM, méthanol 10 %). Le montage est disposé sur la plaque de transfert légèrement imbibé de tampon de transfert. Le transfert des protéines sur la membrane s'effectue à 10 V, 10 min à 1 h selon la taille des protéines à transférer.

17. 1. 2. Transfert liquide.

Pour le transfert de protéines de taille inconnue ou pour un meilleur transfert des protéines de haut poids moléculaire, le transfert liquide est préféré. Le gel est utilisé pour un électrotransfert des protéines sur membrane en PVDF Immobilon-P (Millipore, France) dans l'appareil à transfert liquide (Idea Scientific Company, Minneapolis, USA). En fin d'électrophorèse, la membrane, les feuilles de papier Whatman et les éponges de mousse sont équilibrées pendant 15 min dans le tampon de transfert (Tris base 25 mM, Glycine 150 mM, méthanol 20 %). Une fois le montage effectué et disposé dans une cuve, le transfert s'effectue pendant 2 h à 4 °C.

17. 2. Incubation avec les anticorps

Après transfert des protéines, la membrane est saturée (PBS, lait écrémé 5 %) puis incubée 1h à 37 °C ou sur la nuit à 4 °C avec l'anticorps primaire dilué (voir tableau X pour la liste des anticorps et leurs dilutions) dans le tampon de lavage (PBS, lait 1 %, Tween 20 0,05 %). Une série de lavage (3 fois 15 min) précède la seconde incubation (1 h à 37 °C) avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase dilué au 1/2000^{e} dans le tampon de lavage (voir tableau X). La membrane est de nouveau lavée (3 fois 15 min dans le tampon de lavage) avant d'être révélée.

17. 3. Réaction de chimioluminescence.

La membrane est révélée avec la solution de détection par chimioluminescence du kit ECL (Amersham) ou du kit BM Chemiluminescence (Roche) pendant 1 min puis est exposée à un film radiographique (hyperfilm ECL, Amersham Biosciences ou Curix Ortho HT-L Plus, Agfa) pendant une durée allant de 30 s à 1 h. Les films sont révélés par un développeur automatique (Kodak diagnostic Imaging, M35-MX-OMAT processor).

18. Dosage des activités caspases.

L'activation des protéases suite à l'induction de l'apoptose peut être étudiée soit par détection de leur clivage par immunoblot soit en mesurant leur activité enzymatique à l'aide de substrats tétrapeptidiques fluorogéniques spécifiques. Le dosage de l'activité caspase 3 est réalisé à l'aide du kit (CaspACE Assay Sytem, Fluorometric, Promega). Le substrat utilisé (Ac-DEVD-AMC, Bachem) est utilisé à une concentration finale de 50 μM. Après différents temps de traitement, des extraits protéiques sont réalisés et dosés selon la méthode de Bradford. Les différents

échantillons à tester sont disposés dans une plaque blanche 96 puits à fond plat (Nunc), selon le tableau 20 suivant :

Tampon Caspase	32 µL
DMSO	2 µL
DTT (1mM)	10 µL
Lysat cellulaire	*
H_2O	qsp 98 µL
Incubation 30 min à 37 °C	
Substrat Caspase (2,5mM)	2 µL
Incubation 2 h à 37 °C – lecture fluorescence toutes les 15 min	

Tableau 20 : Distribution des réactifs pour le dosage des activités caspases. * le volume de chaque échantillon est toujours ajusté pour avoir une quantité de protéines égale à 100 µg au maximum.

Le clivage du peptide est suivi en mesurant la fluorescence émise à différents intervalles de temps (toutes les 15 min pendant 2h) à l'aide d'un spectrophotomètre (Fluorolite 1000, Dynatech Laboratories ou Fluoroskan Ascent FL, Thermo Electron Corporation) à une longueur d'onde d'excitation de 365 nm et une longueur d'onde d'émission de 465 nm. La fluorescence mesurée traduit la libération du fluorochrome (AMC) suite au clivage du substrat par la caspase correspondante. A partir de cette cinétique, la pente de la droite est déterminée et l'activité enzymatique spécifique est déterminée et exprimée en unité arbitraire.

RÉSULTATS

I. IMPLICATION DE L'EXTRÉMITÉ C-TERMINALE DE BAX DANS SON OLIGOMÉRISATION AU COURS DE L'APOPTOSE.

Article 1 : Homo-oligomerization of Bax is controlled by its carboxy-terminal extremity.
Er E., Lalier L., Cartron P.F., Oliver L., and Vallette F.M.
Article soumis.

Dans cet article, j'ai réalisé les constructions plasmidiques, les transfections cellulaires, les expériences d'immunocytochimie et l'observation en microscopie confocale, les tests de viabilité, les pontages moléculaires sur les extraits cellulaires et les gels bidimensionnels. Lisa Oliver a contribué aux transfections cellulaires et aux analyses de microscopie confocale. Lisenn Lalier a réalisé certaines expériences de pontage moléculaire. Pierre-François Cartron a réalisé les tests acellulaires, les immunoprécipitations et les doubles-hybrides bactériens. L'ensemble de ces travaux a été dirigé par François M. Vallette.

Dans cette étude, nous nous sommes penchés sur la détermination du rôle de l'extrémité C-terminale de Bax dans les évènements d'adressage à la mitochondrie, d'insertion dans la membrane mitochondriale externe (MME) et de multimérisation. Nous montrons que l'extrémité C-terminale de Bax est impliquée dans la dimérisation de Bax, mais ne modifie pas son activité apoptotique et son adressage à la MME.

Dans un premier temps, nous montrons que la protéine BaxΔC (protéine Bax délétée de ces 21 derniers acides aminés) conserve sa fonction apoptotique (**figures 1B et 3B**) et induit le relargage de cytochrome *c* après induction de l'apoptose par l'étoposide (**figure 2B**). Ces résultats suggèrent que l'extrémité C-terminale de la protéine Bax n'est pas indispensable à sa fonction apoptotique.

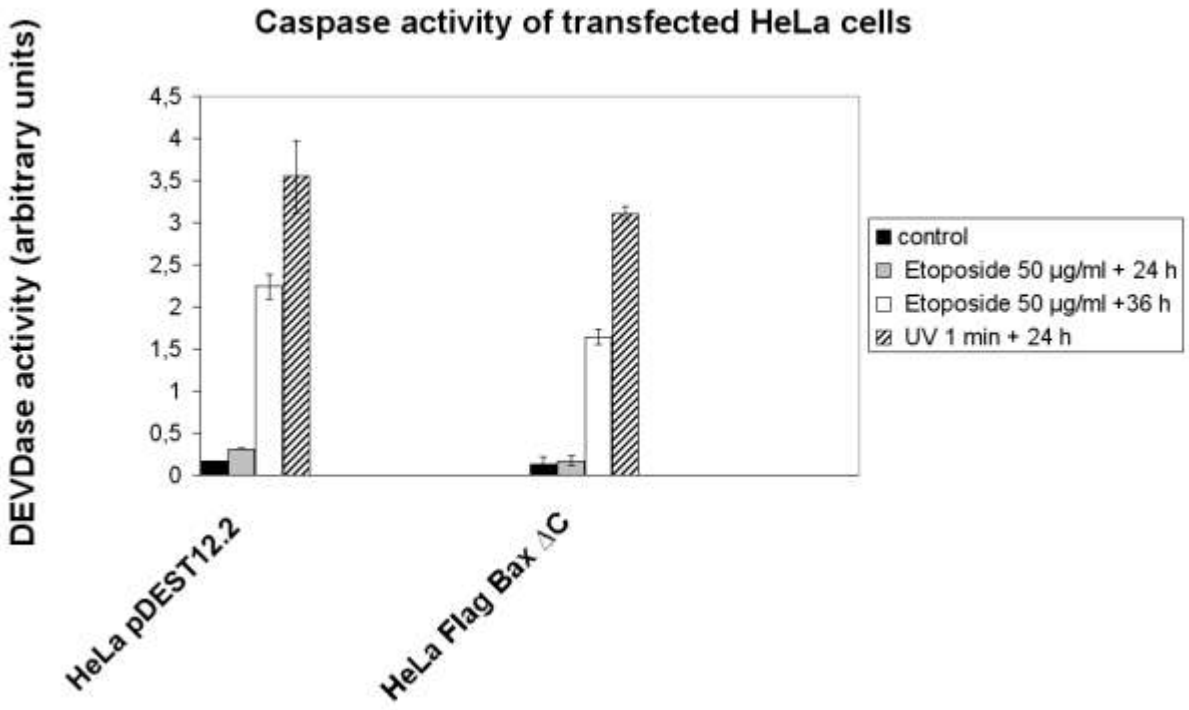


Figure S29 : Mesure de l'activité de la caspase 3 dans les cellules HeLa transfectées avec un vecteur vide (pDEST12.2) ou avec un vecteur contenant la construction FlagBaxΔC.

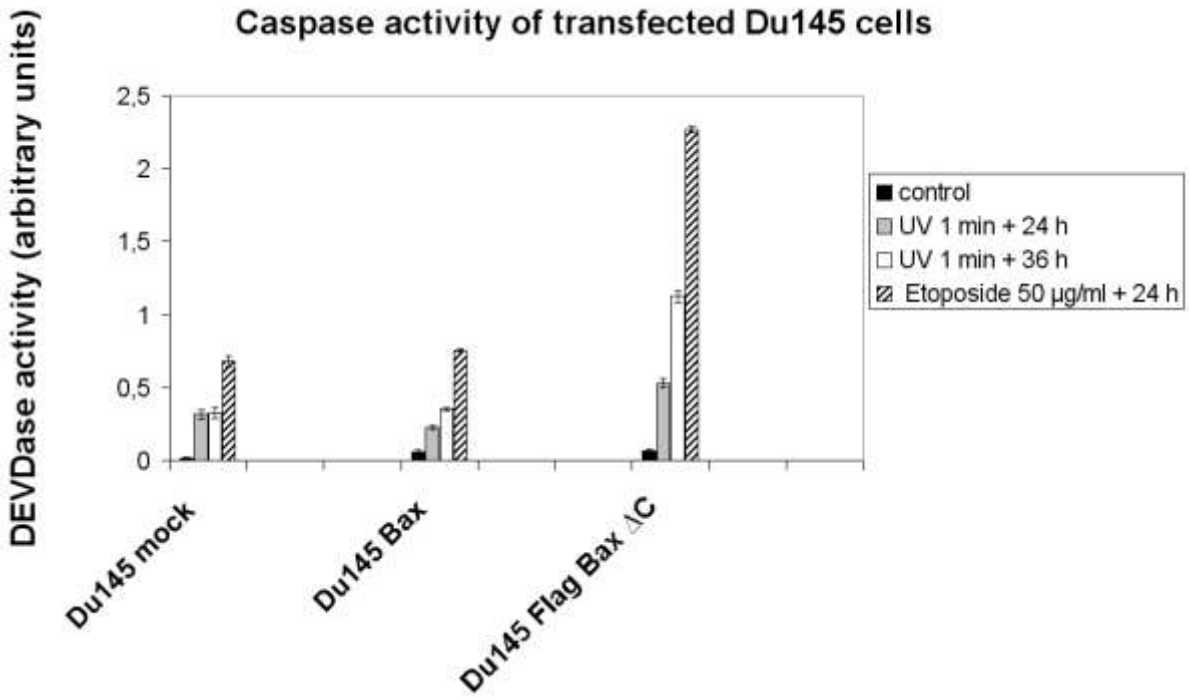


Figure S30 : Mesure de l'activité de la caspase 3 dans les cellules Du145 transfectées avec un vecteur vide (mock) ou avec un vecteur contenant la construction Bax ou FlagBaxΔC.

Nous pouvons observer en outre qu'à ce stade d'induction de l'apoptose, la caspase 3 est activée dans les cellules HeLa (**figure S1**) et dans les cellules Du145 transfectées avec une construction BaxΔC (**figure S2**). Dans les cellules HeLa transfectées avec FlagBaxΔC, la caspase 3 est activée 36 h après le traitement à l'étoposide (50 µg/ml) ou 24 h après irradiation aux UV (1 min d'irradiation) (**figure S1**). Dans les cellules Du145, la caspase 3 est activée 24 h ou 36 h après irradiation aux UV (1 min d'irradiation), et 24 h après traitement à l'étoposide (50 µg/ml) (**figure S2**). L'activité caspase 3 semble curieusement plus élevée dans les cellules Du145 transfectées avec une construction BaxΔC par rapport aux cellules transfectées avec Bax (figure S2). Ce dernier résultat suggère que la délétion de l'extrémité C-terminale de Bax n'interfère pas avec sa fonction apoptotique.

En outre, la délétion de l'extrémité C-terminale n'interfère pas avec sa localisation intracellulaire (**figures 2A et 3C**) : la protéine BaxΔC, tout comme Bax, est relocalisée à la mitochondrie après induction de l'apoptose dans les cellules Du145, suggérant que l'extrémité C-terminale de Bax n'est pas le signal d'adressage à la mitochondrie. Nous montrons en outre que BaxΔC n'oligomérise pas dans les cellules HeLa (**figures 4A et 4B**) ou Du145 (**figure 2C**), suggérant que l'extrémité C-terminale de Bax est impliquée dans son oligomérisation.

Par ailleurs, des expériences de fractionnement cellulaire montrent que la protéine BaxΔC (d'un poids moléculaire de 19 kDa) se localise à la mitochondrie après induction de l'apoptose et s'insère dans la MME, puisque l'intégralité des protéines BaxΔC se trouve dans le culot de mitochondries traitées avec une solution alcaline (culot TA) (**figure S3**). En revanche, en condition contrôle, une partie de BaxΔC se localise à la mitochondrie mais n'est que faiblement associée à la mitochondrie, puisque la totalité des protéines BaxΔC est trouvée dans le surnageant de mitochondries traitées avec une solution alcaline (S/N TA) (**figure S3**).

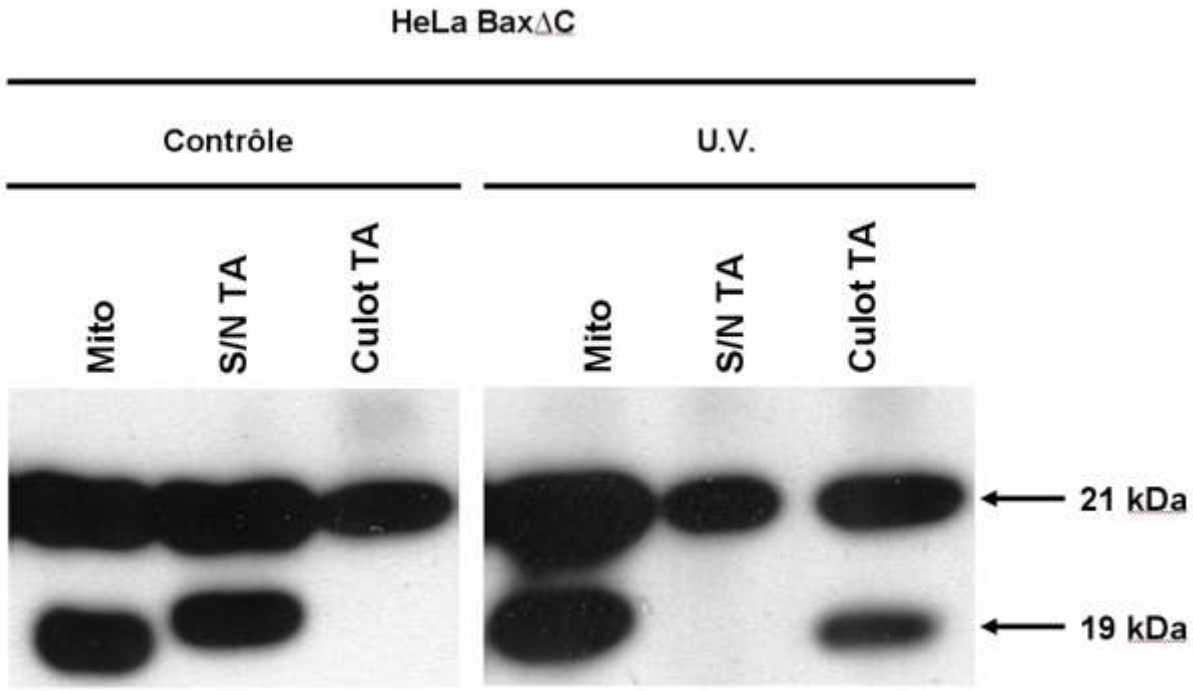


Figure S31 : Localisation subcellulaire de Bax et de BaxΔC dans les cellules HeLa en condition contrôle et en condition apoptotique. Un fractionnement cellulaire est réalisé après 24 h sur des cellules HeLa irradiées (U.V.) ou non (Contrôle) aux UV pendant 1 min. Les mitochondries ont été incubées dans une solution alcaline 1 h à 4°C (traitement alcalin, TA) puis ont été centrifugées à 8 000 g pendant 20 min à 4 °C. Les mitochondries non traitées (Mito), le surnageant (S/N TA) et le culot (culot TA) obtenus après traitement alcalin des mitochondries ont été déposés sur gel SDS-PAGE 12 % et un western-blot classique a été réalisé. La membrane a été incubée avec un anti-corps anti-Bax (DakoCytomation) puis avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase. La révélation se fait par chimioluminescence. Nous pouvons détecter le Bax endogène (à 21 kDa) et le BaxΔC qui migre à 19 kDa.

Nous avons montré ensuite par la méthode des gels bidimensionnels que BaxΔC n'est retrouvé que sous forme monomérique au niveau des mitochondries et que nous ne trouvons pas BaxΔC dans des complexes de haut poids moléculaire (**figure 4C**).

Nous montrons par ailleurs dans un test en système acellulaire que BaxΔC ne dimérise pas après induction par tBid (truncated Bid) ou par la température (43 °C) contrairement à Bax (**figures 5A et 5B**). Des résultats similaires ont été obtenus avec BaxL63E (**figure 5A**), mutation qui est connue pour empêcher l'oligomérisation de Bax (Cartron *et al.,* 2004b). En outre, la substitution de l'extrémité C-terminale de Bax par celle de Bcl-xL (BaxTMxL) permet l'oligomérisation, suggérant que l'oligomérisation de Bax est sous le contrôle de la présence d'une hélice α hydrophobique en C-terminale.

De plus, nous montrons par immunoprécipitation que Bax s'oligomérise avec lui-même, mais pas avec BaxΔC et que BaxΔC est incapable de s'oligomériser avec lui-même après induction par tBid ou par la température (43 °C) (**figure 5A**). Ces résultats montrent que BaxΔC est incapable d'oligomériser même en présence de Bax.

Enfin, nous montrons que l'extrémité C-terminale de Bax n'est pas le domaine de dimérisation. Nous montrons par un test de double-hybride bactérien que a construction hélice α9 de Bax fusionnée à la protéine fluorescente rouge (RFP-Hα9) n'interagit avec aucune des constructions testées (Bax, Hα1-RFP, RFP-Hα9 et BH3-RFP), suggérant que cette hélice α9 n'est pas le domaine d'oligomérisation de Bax (**figure 6A**). En outre, nous montrons par pontage moléculaire que Bax, tout comme Hα1-RFP (hélice α1 de Bax fusionnée à la RFP), sont capables de dimériser. En revanche, nous n'observons pas de dimères de BaxΔC ou de dimères de Hα-9-RFP (**figure 6B**).

L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'extrémité C-terminale de Bax, correspondant à l'hélice α9, contrôle la dimérisation de Bax mais n'est pas le domaine de dimérisation. Nous confirmons en outre que l'extrémité C-terminale de Bax n'est pas le signal d'adressage à la mitochondrie.

Mise au point des expériences de pontage moléculaire.

Afin de mettre en évidence l'oligomérisation de Bax et du mutant BaxΔC, ainsi que les interactions putatives avec d'autres protéines, nous avons mis en œuvre des expériences de pontage moléculaire. Ces tests sont basés sur l'utilisation de différents agents pontants qui, en présence de deux protéines suffisamment proches l'une de l'autre, forment des complexes covalents.

Dans ces expériences, nous avons utilisé 4 agents pontants : le DMA (Dimethyl adipimidate), le DMS (Dimethyl suberimidate), le DSS (Disuccinimidyl suberate) et l'EGS [Ethylene glycolbis(succinimidylsuccinate)] (tableau 21). Ces agents pontants réagissent avec les fonctions amines des protéines.

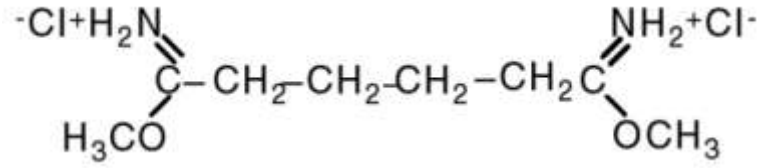
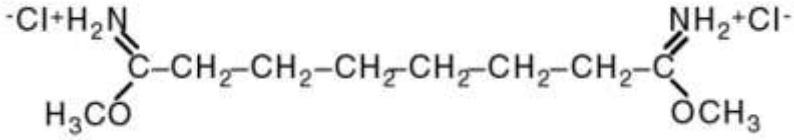
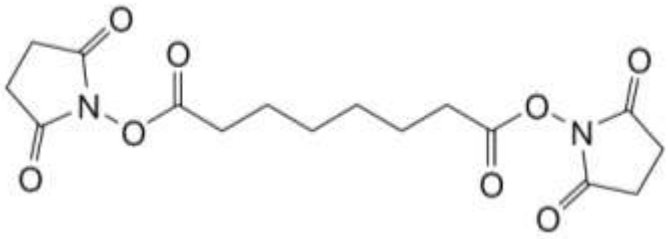
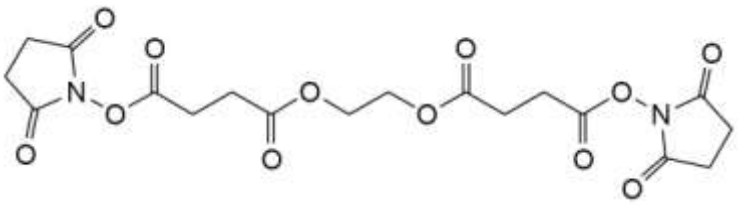
Nom	Structure	Propriétés
DMA		- soluble dans l'eau - membrane perméable - bras espaceur : 8,6 Å - groupement réactif : imidoester
DMS		- soluble dans l'eau - bras espaceur : 11 Å - groupement réactif : imidoester
DSS		- soluble dans le DMSO - bras espaceur : 11,4 Å - groupement réactif **:** N-hydroxysuccinimide -ester
EGS		- soluble dans le DMSO - bras espaceur : 16,1 Å - groupement réactif : N-hydroxysuccinimide -ester

Tableau 21 : Structure et quelques propriétés des différents agents pontants utilisés pour les pontages moléculaires.

Après incubation des protéines avec l'agent pontant (voir Matériel et Méthode pour le protocole), les mélanges sont déposés sur gel SDS-PAGE et la révélation est réalisée par chimioluminescence après un western-blot. Pour contrôle, nous avons déposé sur gel la quantité équivalente de protéines incubées avec l'agent de solubilisation des agents pontants (eau ou DMSO selon le cas, voir tableau 21).

Nous avons testé plusieurs concentrations d'agent pontant : 2 ou 5 mM. L'ensemble des tests réalisés avec différentes concentrations d'agent pontant ont montré les mêmes résultats représentés figure 37.

Sur la partie droite de la figure 37 (MITO), nous pouvons observer la formation d'oligomères de Bax en présence de DSS ou d'EGS à la concentration de 2 mM ou 5 mM. Ceci suggère que Bax est sous une forme oligomérisée au niveau des mitochondries après induction de l'apoptose par les UV. En revanche, on ne distingue pas la formation de tels oligomères sur les échantillons contrôles. De même, on ne distingue pas, ou quasiment pas, la formation d'oligomères avec les agents pontants DMA et DMS, quelle que soit la concentration utilisée. Ceci suggère que les protéines constituants les oligomères observés en présence de DSS ou d'EGS sont à une distance supérieure à 11 Å l'une de l'autre mais inférieure ou égale à 16 Å.

Par ailleurs, nous n'observons pas d'oligomères sur les fractions cytosoliques (S100), quel que soit l'agent pontant utilisé (partie gauche de la figure 37). Ceci suggère que soit les oligomères se forment uniquement au niveau des mitochondries, soit que les oligomères se forment dans le cytosol à un stade plus précoce de l'apoptose mais dans ce cas, ils sont rapidement transloqués à la mitochondrie et ne sont pas détectables dans le cytosol.

Dans les expériences ultérieures, nous n'emploierons que les agents pontants EGS et DSS à la concentration de 2 mM, cette concentration étant suffisante pour observer l'oligomérisation de Bax.

Ces expériences renforcent l'hypothèse que Bax s'oligomérise au niveau de la mitochondrie après induction de l'apoptose.

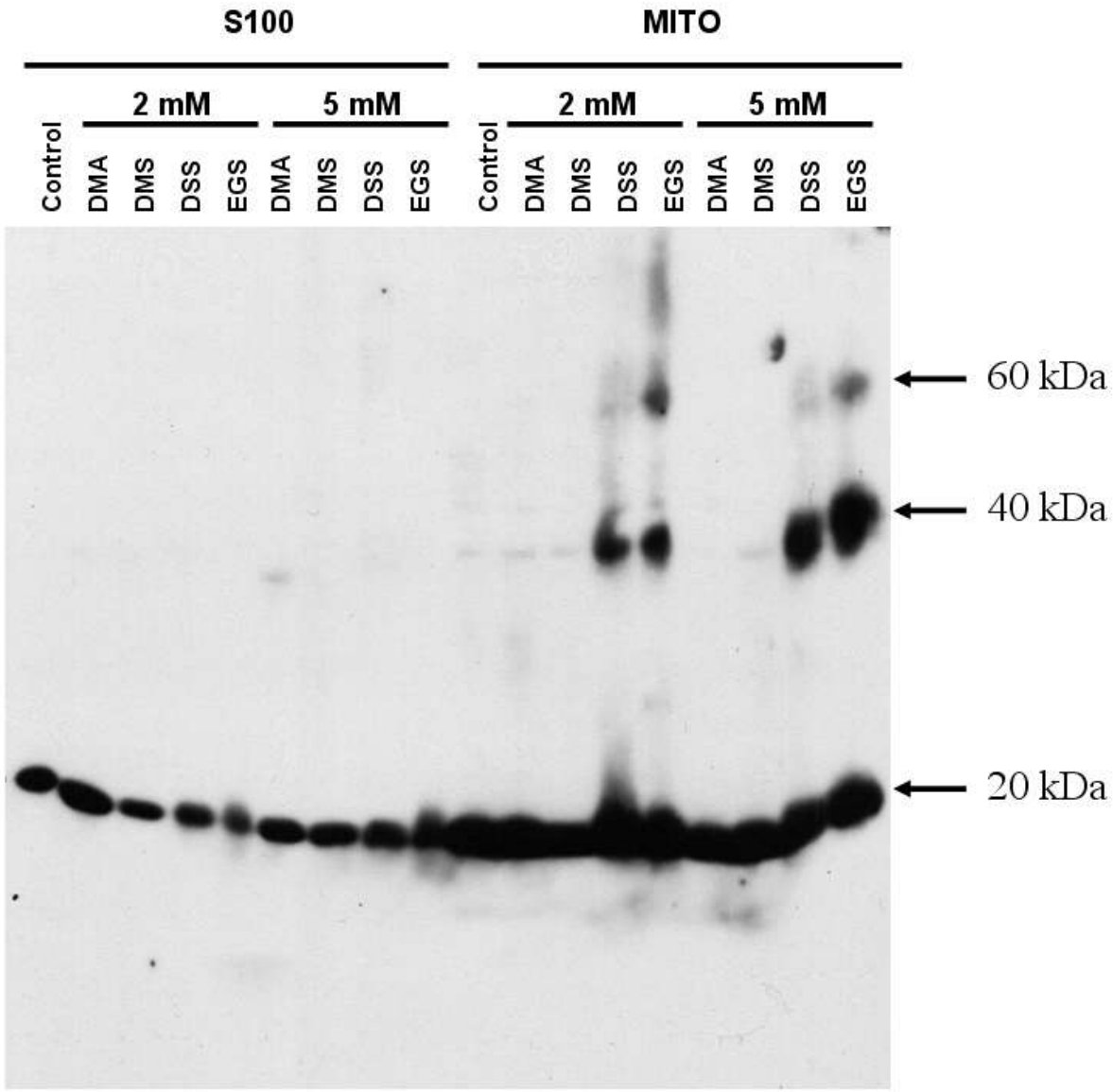


Figure 37 : Test des différents agents pontants sur les fractions cytosoliques (S100) et mitochondriales (MITO) de cellules HeLa. Les extraits S100 et MITO sont obtenus par fractionnement cellulaire de cellules HeLa irradiées 1 min aux UV, 12 h après le traitement. La membrane de western-blot a été incubée avec l'anticorps anti-Bax (DakoCytomation) puis avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase. La révélation a été effectuée par chimioluminescence.

J Biol Chem. 2007 Aug 24;282(34):24938-47.

Article 1

J Biol Chem. 2007 Aug 24;282(34):24938-47.

CONTROL OF BAX HOMO-DIMERIZATION BY ITS CARBOXY-TERMINAL.

Emine Er[1,2], Lisenn Lalier[1,2], Pierre-François Cartron[1,2], Lisa Oliver[1,2] and François M. Vallette[1,2].
From [1] INSERM U601, Département de Recherches en Cancérologie de Nantes, France and the [2] Université de Nantes, Faculté de Médecine, 9 Quai Moncousu F-44035 Nantes. Cedex 01 France.
Running title: **Bax dimerization**
Address correspondence: Dr François M. Vallette, UMR 601 INSERM/Université de Nantes, 9 Quai Moncousu 44035 CEDEX 01. France Tel: 33-240084081, fax: 33-240084082, e-mail: francois.vallette@univ-nantes.fr

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

SUMMARY

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

INTRODUCTION

Proteins of the Bcl-2 family (pBcl-2s) are essential for the implementation of the cell death program called apoptosis (1). This family is defined by structural and sequence homology of at least one domain. Typically anti-apoptotic members of this family (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W) comprise 4

domains of homology termed BH1-4 while pro-apoptotic members are limited to 3 domains BH1-3 (multi-domain proteins such as Bax and Bak) or only a BH3 (e.g. Bad or Bid) (1). The latter class is divided into two sub-groups: Bad-like that acts as inhibitors of anti-apoptotic members or Bid-like that act as activators of Bax (2). The BH3 domain is implicated in the homo- and hetero-dimerization of pBcl-2s, a process that is central to the control of mitochondrial permeability, which is essential for the completion of the apoptotic program (3). The apoptotic mitochondrial outer membrane permeabilization (AMOMP), which leads to the release of intermembrane mitochondrial proteins such as cytochrome c, smac/Diablo and AIF, is under the control of Bax and Bak (3). In healthy cells, Bax is a monomeric protein soluble in the cytosol or loosely attached to outer mitochondrial membrane. Upon the induction of apoptosis, Bax undergoes a change in the conformation resulting in the translocation to the mitochondria and the subsequent formation of oligomers, which are supposed to be involved in the formation of AMOMP via the formation of channels or pores (4). Thus, oligomerization appears to be essential to AMOMP but the precise molecular mechanism is not completely understood. Recent data from Annis *et al*. (5) suggest that membrane permeabilization occurs through the recruitment of monomers embedded in the membrane and thus the assemblage of oligomers occurs within the mitochondrial member (or in close proximity) and not in the cytosolic compartment. It has been suggested that the last alpha helix of Bax (i.e. Hα-9) was the addressing/membrane anchor domain of the protein based on its homology with equivalent domains in anti-apoptotic pBcl-2s (6). However, others and we have shown that this domain was essential for neither its mitochondrial addressing nor its pro-apoptotic activity in yeast and mammals (reviewed in 4). In addition, Bax lacking its Hα-9 (BaxΔC) appears to be more effective than full length Bax α (FLBax) to form channels in the mitochondrial membrane (7). Structural analyses suggest that although the Hα-9 of Bax is anchored in the membrane, its actual role is more complex than primarily assumed (4).

In this work, we have analyzed apoptosis induced by a Bax construct lacking the Hα-9 (BaxΔC). We show that BaxΔC induced apoptosis in a cell line deficient in endogenous Bax as well as in a cell line expressing Bax. However, BaxΔC appears to be a monomer both in the cytosol and in the mitochondria under healthy or apoptotic conditions suggesting that BaxΔC cannot form oligomers with itself or with FLBax.

We also show that substitution of Hα-9 by the equivalent segment of Bcl-xL (BaxTMxL) restores this capacity to form oligomers. Thus, confirming that the carboxy-terminal of Bax (Bax-CT) is not involved in mitochondrial addressing but in oligomerization. Indeed, monomers of BaxΔC are capable of inducing AMOMP with a similar efficiency as that observed with FLBax.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials

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

Cell culture

The human cell line HeLa was grown in complete RPMI (RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 2 mM glutamate). The human cell line Du145 (gift from Dr P.T Daniel, Max Delbruck Center for Molecular Medicine, Berlin-Buch, Germany) was grown in complete DMEM complete (DMEM medium 4500 mg/l glucose supplemented with 10% FBS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 2 mM glutamate). Cells were cultured at 37°C in an environment of 5% CO_2-95% air in a humidified atmosphere. Apoptosis was induced in semi-confluent (50 to 70%) cultures and cell viability was determined by Trypan blue exclusion.

Plasmids construction

The pRcCMV/FLBax, pRcCMV/BaxΔC and pRcCMV/BaxTMxL were as described in (8). GFP-FLBax and GFP-BaxΔC were obtained by site-directed mutagenesis using the PCR-based Gateway method then subcloned into a pcDNA-DEST53 plasmid according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Primers used were Bax-S (GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTA ATG GAC GGG TCC GGG GAG

CAG CCC) and Bax-AS (GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC GCC CAT CTT CTT CCA GAT GGT G) (for Bax) or BaxΔC-AS (GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC CTG CCA CGT GGG CGT CCC AAAGTA G) (for BaxΔC).

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

Flag-FLBax, cloned into pDEST12.2 was subjected to mutagenesis to obtain the L63E mutant using the site-directed mutagenesis system from Invitrogen with the oligonucleotide 5'-ACCAAGAAGCTGAGCGAGTGTGAGA AGCGCATCGGGGAC-3' (the mutated sequence is underlined). The construction of the Hα1-RFP and RFP-Hα9 plasmids was as described in (9).

Cell transfection

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

Cell fractionation

After the induction of apoptosis by UV-irradiation (1 min) or etoposide treatment, the cells were collected (16h, 24h or 36h after the treatment) and centrifuged at 1 000g for 10 min at 4°C. The cell pellets were washed twice with ice-cold PBS then resuspended in v/v CEB [250 mM sucrose; 50 mM HEPES pH 7.4, 50 mM KCl, 2 mM MgCl2, 1 mM dithiothreitol (DTT), 10 mM cytochalasin B, 1 mM EGTA and 1 tablet protease inhibitor] as previously described (1). Cells were allowed to swell for 30 min on ice then homogenized with 30 strokes in a 2 ml glass Dounce homogenizer. The

homogenates were centrifuged at 750g for 10 min at 4°C and the resulting supernatants centrifuged a further 15 min at 15 000g at 4°C. The mitochondrial pellets (Mito) were resuspended in CEB. The supernatant was further centrifuged at 100 000g for 30 min in an airfuge (Beckman, USA) and the resulting supernatant (S100) was further referred as the cytosolic fraction.

Microinjection

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

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

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

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

Cross-linking experiments

For cross-linking experiments with EGS or DSS, 50 µg mitochondrial (Mito) and cytosolic fractions (S100) were incubated in the absence or in the presence of 2 mM EGS or DSS for 45 min at room temperature. The cross-linker DSS was added to IVT-Bax, BaxΔC, Hα1-RFP and RFP-Hα-9 at a final concentration of 5 mM at pH 7.8 to trigger dimerization (10). After incubation for 30 min at room temperature, the cross-linker was quenched with 25 mM

Tris-HCl (pH 7.5). Bax oligomerization was analyzed in 12% SDS–PAGE, followed by Phosphorimager analysis.

Western-blots

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

Laser confocal microscopy

For confocal analysis, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde/0.9% picric acid in PBS for 30 min. After a 10 min permeabilization with 0.1% SDS/PBS and a saturation with 5% gelatin/PBS for 1h, the cells were incubated with polyclonal anti-F1-ATPase (1/1000; a gift from Prof. J. Lunardi) for 1h then washed and incubated overnight at 4°C with anti-Bax antibodies (2µg). After extensive washing, the cells were incubated with secondary antibodies for 1h. All incubations were done at room temperature unless stated otherwise. Images were visualized using a Leica TCS NT microscope with a 63x 1.3 NA Fluotar objective (Leica, France). Quantification of the overlay of labeling was done using the Metamorph program (http://www.image1.com/products/metamorph). Briefly, the correlation coefficient (r) is a measure of the strength of the relationship between two variables x (labeling specific for mitochondria) and y (labeling of Bax).

Blue Native-PAGE

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

Quantification of immunoblots

Bands were quantified using the Image J program at http///rsb.info.nih.gov/ij/

Induction of oligomerization

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

Immunoprecipitation

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

Bacterial Two-hybrid Assay

The interaction between the different Bax domains was assayed using the Bacteriomatch™ two-hybrid system (Stratagene) as described earlier (13). This assay measured the interaction between polypeptides fused to the NT of RNA polymerase α in a target plasmid (pTRG) and a sequence fused to the bacteriophage λcl protein in a bait plasmid (pBT). The interaction between the proteins ensured the survival of bacteria in a selective media as described in (13). The oligomerization of Bax was screened using as a bait the plasmids encoding for Bax (pBT-Bax), Hα-1-RFP (pBT-Hα-1-RFP), Hα-9-RFP (pBT-Hα-9-RFP) and BH3-RFP (pBT-BH3-RFP),

whereas the target plasmids encoded for the Hα-9-RFP (pTRG-RFP-Hα-9) and the BH3-RFP (pTRG-BH3-RFP). Bacteria transformation, growth, and selection were performed according to the manufacturer's instructions (www.stgn.com/manuals/982000.pdf).

RESULTS

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

Others and we have shown that the Bax-CT was not essential for its sub-cellular localization or its apoptotic function in several cell lines (8,9,14-16). A prostate carcinoma cell line (Du145, which does not express Bax) was transfected with a human Bax construct in which the last 21 amino acids (i.e. a.a. 170-191) were deleted and a flag-tag added to the N-terminal (flag-BaxΔC). The sub-cellular localization and apoptotic activity of this construct was compared to that of full length Bax (i.e. FLBax). It should be noted that we were not able to obtain a stable transfected cell line exhibiting a high expression of BaxΔC as the over-expression of this construct appeared highly toxic for these cells (**data not shown**). As demonstrated in **figure 1A**, the cell lines used exhibited a two-fold difference between FLBax and flag-BaxΔC variants. Interestingly, despite this difference in expression, the viability of cells was more affected in the BaxΔC expressing cells (**figure 1B**), suggesting again that the construct was more toxic than its wild type counterpart. We have recently described several cell lines derived from human gliomas, which do not express Bax (Bax-/Bak+ GBM) or Bax and Bak (Bax-/Bak- GBM) (11). We expressed the BaxΔC construct in these cell lines to study the influence of endogenous Bak on BaxΔC activity. Apoptosis was induced either by UV or by staurosporine (STS) treatments (see experimental procedures) in transfected cells, which expressed similar amounts of BaxΔC (**data not shown**). Cell death was monitored by either Trypan blue exclusion or DEVDase activity as described earlier (11). No or little cell death was observed in these cells in absence of apoptotic stimuli while, on the other hand, similar cell death levels were observed in these cell lines indicating that the presence of Bak did not affect the activity of BaxΔC (**fig. 1C**).

One of the hallmarks of apoptosis is the release of cytochrome c from the mitochondria to the cytosol due to an apoptosis-induced mitochondrial permeabilization, which is mostly due to Bax translocation to mitochondria (17). To determine whether the release of cytochrome

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

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

The oligomerization of BaxΔC is also deficient in Bax expressing HeLa cells.

It could be possible that the lack of endogenous FLBax was responsible for the absence of oligomerization observed above. To address this question, we used HeLa cells, which express FLBax. To discriminate the exogenous from endogenous Bax, a green fluorescent protein (GFP) or a flag-tag was fused to the N-terminus of FLBax or

BaxΔC (see the Experimental procedures). As shown in **figure 3A** the expression of Bax in HeLa cells was similar in GFP-Bax and GFP-BaxΔC cells. However, we were able to obtain only a weak expression of the flag-BaxΔC construct (**figure 3A**). Nonetheless, the expression of BaxΔC constructs induced a rapid response to apoptosis when compared to their wild type counterparts (**figure 3B**). We could not obtain viable cells expressing flag-FLBax (data not shown), probably because the addition of the flag-tag to NT-Bax provoked a change in conformation that enhanced its apoptogenic properties (8,16). On the other hand, we were able to obtain a stable expression of Bax constructs in which GFP was fused to the N-terminal of FLBax and BaxΔC. The subcellular localization of the resulting constructs (i.e. GFP-FLBax and GFP-BaxΔC) was assessed by laser confocal microscopy in HeLa cells. As shown in **figure 3C**, both constructs were found mostly mitochondrial, a result different from previous reports (23) but similar to that obtained in HL60 cell line (8). In parallel, we analyzed the cross-linked products of untagged FLBax and BaxΔC or flag-BaxΔC in HeLa cells in the cytosolic and mitochondrial fractions of untreated and apoptotic cells (see Experimental procedures). As shown in **figure 4A**, an analysis of the cross-linked products of untagged Bax in apoptotic (i.e. UV-B-treated) or healthy (i.e. untreated) samples showed that both constructs were present as monomers in the cytosols of healthy and apoptotic cells. FLBax oligomers (dimers and possibly trimers) were formed during apoptosis in non-transfected or in FLBax-transfected mitochondrial fractions. However, under similar conditions, BaxΔC appeared monomeric as no oligomers of high molecular weight corresponding to FL-Bax-BaxΔC or BaxΔC-BaxΔC dimers were found in the mitochondrial fractions from apoptotic cells (**figure 4A**). These results were confirmed in flag-BaxΔC transfected cells after immunodetection of BaxΔC cross-linked products using an anti-flag antibody (**figure 4B**).

Blue-native (BN)-PAGE allows the analysis of protein complexes by separating complexes essentially according to their size (24). BN-PAGE was used to examine the oligomerization status of FLBax and BaxΔC in mitochondria isolated from HeLa cells. As shown in **figure 4C**, Bax was present mainly as a low molecular weight complex (i.e. 21 kDa) in both fractions in healthy cells and the molecular weight of the complexes increased during apoptosis. However, in both healthy and apoptotic cells, flag-BaxΔC, detected with an anti-flag antibody,

presented a molecular organization consistent with a monomeric structure, although two spots were observed (**figure 4C**). Taken together, our results suggest that BaxΔC resides in mitochondria as monomers during apoptosis despite the presence of endogenous Bax in HeLa cells.

Bid- or temperature-induced oligomerization of Bax is abolished in BaxΔC construct.

We assayed the influence of the oligomerization of Bax in an acellular assay as described earlier (11). Briefly, *in vitro* translated (IVT)-Bax constructs labeled with ^{35}S-methionine were activated by either raising the temperature or co-incubation with 8 fmol recombinant truncated (rt)-Bid. After the removal of rt-Bid, the presence of monomers or dimers of the various IVT-Bax constructs were determined under native or denaturing PAGE conditions. The incubation of FLBax or flag-FLBax with rt-Bid or at 43°C induced the formation of dimers while under similar conditions, BaxΔC or flag-BaxΔC remained monomeric (**figure 5A**). As expected, similar results were obtained with a Bax variant with a mutation in the BH3 domain (i.e. L63E), which has been shown to prevent oligomerization (25) (**figure 5A**). Interestingly, the BaxTMxL, a construct in which the Bax-CT was replaced by its equivalent Bcl-xL segment, underwent a dimerization process when treated by a change in temperature (43°C) or the addition of rt-Bid. It should be added that BaxTMxL has been shown to associate with mitochondria *in vitro* but was incapable of inducing apoptosis after transfection into HL60 cells or in yeast (26). These results suggest that the oligomerization of Bax can be trigger by another hydrophobic C-terminal and that this oligomerization is not a prerequisite for its apoptotic function.

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

The Bax-CT is not a dimerization domain.

Our results show that a deletion of Bax-CT interfered with Bax dimerization *in vitro* and in an acellular assay. One possibility is that H$\tilde{\alpha}$9 could dimerize with

the equivalent segment in another Bax molecule or with the BH3 domain. To test this hypothesis, we analyzed the capacity of Hα̃9 to form a stable complex with itself or with Bax BH3 using a double hybrid assay in bacteria (see Experimental procedures). We used a construct in which Bax Hα̃9 was fused to the C-terminal end of the red fluorescent protein (RFP). As shown in **figure 6A**, the RFP-Hα̃9 constructs were used as bait and did not interact with any of the constructs tested. As a control, we used a Bax BH3 domain fused to RFP as it forms a stable complex with itself under these conditions (**figure 6A**). In parallel, we analyzed the cross-linked products formed upon the incubation of FLBax, BaxΔC and RFP-Hα-9 constructs at pH 7.8, which is known to induce dimerization (10). As shown in **figure 6B**, the incubation of IVT FLBax at pH 7.8 induced its dimerization as assessed by cross-linking of the IVT construct while it remained monomeric at pH 7.4. Conversely, under the same conditions, no dimers were observed with RFP-Hα̃9 or BaxΔC (**figure 6B**). In addition, cytosolic BaxΔC obtained from Du145 transfected cells was treated with Triton X-100 under conditions, which promote the dimerization of Bax (27). **Figure 6C** shows that detergent-treated BaxΔC was still capable of forming dimers suggesting that the Hα-9 only indirectly controls the dimerization process of Bax and that it is neither sufficient nor necessary for this process.

DISCUSSION

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

The data presented here shows that the Bax-CT was involved in the oligomerization step but that monomers formed by BaxΔC are still capable of inducing AMOMP and cell death. Indeed, the expression of BaxΔC in Du145 is capable of inducing apoptosis and

promoting cytochrome c release from mitochondria (**figure 1**), even though it is present as monomers in the mitochondria isolated from dying cells while FLBax formed mainly dimers (**figure 2**). This result suggests that Bax-CT could be important for the formation of oligomers. The ability of flag-BaxΔC to oligomerize with endogenous FLBax was assessed in HeLa cells (**figure 3**). BaxΔC translocation to mitochondria was observed using a GFP-BaxΔC construct. Indeed, contrary to previous reports, our GFP-BaxΔC construct translocated to mitochondria after the induction of apoptosis. The oligomerization of BaxΔC and flag-BaxΔC in HeLa cells was first analyzed by cross-linking cytosolic and mitochondrial proteins in both healthy and apoptotic cells and then secondly, by evaluating the molecular complexes formed by Bax in BN-PAGE and SDS-PAGE followed by immunodetection (**figure 4**). The data obtained showed that BaxΔC could not form oligomers with itself or with endogenous FLBax. We also used a cell free assay in which the different Bax constructs, activated either with rt-Bid or by a rise in temperature were incubated and the resulting complexes analyzed in BN-PAGE (**figure 5**). FLBax were capable of forming dimers under these conditions while BaxΔC was present only as monomers. A similar result was obtained with the FLBax-L63E construct, which has been shown to be unable to homodimerize *in vitro*. Interestingly, the substitution of Bax Hα-9 by Bcl-xL Hα-8, which is involved in the association of Bcl-xL with mitochondria during apoptosis, restored the capacity of BaxΔC to homodimerize (**figure 5**). Interestingly, the co-incubation of BaxΔC with FLBax did not lead to the formation of heterodimers, suggesting that the presence of a C-terminal in both partners was required (**figure 5**). One possibility implied by the latter results was that dimerization occurred directly through the C-terminal as described in several other membrane proteins. This hypothesis was analyzed in the double hybrid assay in bacteria or by cross-linking, then determining the interaction between different Hα-9 constructs. As shown in **figure 6**, the presence of Bax Hα-9 did not induce the oligomerization of soluble RFP ruling out the involvement of a direct interaction of this Hα in Bax oligomerization. Exposure of FLBax to detergent induces the irreversible formation of high order oligomers. Of note, detergent treated BaxΔC formed dimers demonstrating that it is not absolutely required in the formation of dimers (**figure 6**).

Taken together, our results suggest that the presence of Bax-CT is required for

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

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

Acknowledgments: This work was supported by grants from “Ligue Nationale contre le Cancer” (LNC, programme équipe labellisée), the “Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale” (INSERM) and the “Agence Nationale de la Recherche” (ANR, project MABA).

REFERENCES

1. Cory, S., and Adams, J. M. (2002) *Nat Rev Cancer* **2**(9), 647-656
2. Willis, S. N., and Adams, J. M. (2005) *Current Opinion in Cell Biology* **17**(6), 617-625
3. Scorrano, L., and Korsmeyer, S. J. (2003) *Biochem Biophys Res Commun* **304**(3), 437-444
4. Er, E., Oliver, L., Cartron, P.-F., Juin, P., Manon, S., and Vallette, F. M. (2006) *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1757**, 1301-1311
5. Annis, M., Soucie, E., Dlugosz, P., Cruz-Aguado, J., Penn, L., Leber, B., and Andrews, D. (2005) *EMBO J.* **24** (12), 2096-103.

6. Schinzel, A., Kaufmann, T., and Borner, C. (2004) *Biochim Biophys Acta* **1644**(2-3), 95-105
7. Schendel SL, M. M., Reed JC. (1998) *Cell Death Differ.* **5**(5), 372-380.
8. Tremblais, K., Oliver, L., Juin, P., Le Cabellec, T. M., Meflah, K., and Vallette, F. M. (1999) *Biochem Biophys Res Commun* **260**(3), 582-591
9. Cartron, P.-F., Priault, M., Oliver, L., Meflah, K., Manon, S., and Vallette, F. M. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**(13), 11633-11641
10. Cartron, P. F., Oliver, L., Mayat, E., Meflah, K., and Vallette, F. M. (2004) *FEBS Lett* **578**, 41-46
11. Cartron, P. F., Juin, P., Oliver, L., Martin, S., Meflah, K., and Vallette, F. M. (2003) *Mol Cell Biol* **23**(13), 4701-4712
12. Pagliari, L. J., Kuwana, T., Bonzon, C., Newmeyer, D. D., Tu, S., Beere, H. M., Green, D. R., and (2005) *PNAS* **102**, 17975-17980
13. Cartron, P. F., Gallenne, T., Bougras, G., Gautier, F., Manero, F., Vusio, P., Khaled, M., Vallette, F. M., and Juin, P. (2004) *Mol Cell* **16**, 807-818
14. John, G. B., Anjum, R., Khar, A., and Nagaraj, R. (2002) *Experimental Cell Research* **278**(2), 198-208
15. Zha, H., Fisk, H. A., Yaffe, M. P., Mahajan, N., Herman, B., and Reed, J. C. (1996) *Mol Cell Biol* **16**(11), 6494-6508
16. Priault, M., Cartron, P. F., Camougrand, N., Antonsson, B., Vallette, F. M., and Manon, S. (2003) *Cell Death Differ* **10**(9), 1068-1077
17. Adams, J. M. (2003) *Genes Dev.* **17**(20), 2481-2495
18. Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B., and Martinou, J. C. (2000) *Mol Cell Biol* **20**(3), 929-935
19. Antonsson, B., Montessuit, S., Lauper, S., Eskes, R., and Martinou, J. C. (2000) *Biochem J* **345 Pt 2**, 271-278
20. Roucou, X., Montessuit, S., Antonsson, B., and Martinou, J. C. (2002) *Biochem J* **368**(Pt 3), 915-921
21. Soucie, E. L., Annis, Matthew G., Sedivy, John, Filmus, Jorge, Leber, Brian, Andrews, David W., Penn, Linda Z. (2001) *Mol. Cell. Biol.* (21), 4725-4736
22. Cassinelli, G., Supino, R., Zuco, V., Lanzi, C., Scovassi, A. I., Semple, S. C., and Zunino, F. (2004) *Biochemical Pharmacology* **68**(5), 923-931
23. Nechushtan, A., Smith, C. L., Hsu, Y. T., and Youle, R. J. (1999) *Embo J* **18**(9), 2330-2341
24. Frank, K. (2006) *ELECTROPHORESIS* **27**(13), 2759-2781
25. Wang, K., Gross, A., Waksman, G., and Korsmeyer, S. J. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**(10), 6083-6089
26. Oliver, L., Priault, M., Tremblais, K., LeCabellec, M., Meflah, K., Manon, S., and Vallette, F. M. (2000) *FEBS Lett* **487**(2), 161-165
27. Hsu, Y. T., and Youle, R. J. (1997) *J Biol Chem* **272**(21), 13829-13834
28. Suzuki, M., Youle, R. J., and Tjandra, N. (2000) *Cell* **103**(4), 645-654
29. Simonian, P. L., Grillot, D. A. M., Andrews, D. W., Leber, B., and Nunez, G. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**(50), 32073-32077
30. Guihard, G., Bellot, G., Moreau, C., Pradal, G., Ferry, N., Thomy, R., Fichet, P., Meflah, K., and Vallette, F. M. (2004) *J Biol Chem* **279**(45), 46542-46550
31. Basanez, G., Zhang, J., Chau, B. N., Maksaev, G. I., Frolov, V. A., Brandt, T. A., Burch, J., Hardwick, J. M., and Zimmerberg, J. (2001) *J Biol Chem* **276**(33), 31083-31091
32. Jeong, S. Y., Gaume, B., Lee, Y. J., Hsu, Y. T., Ryu, S. W., Yoon, S. H.,

and Youle, R. J. (2004) *Embo J* **23**(10), 2146-2155
33. O'Neill, J. W., Manion, M. K., Maguire, B., and Hockenbery, D. M. (2006) *Journal of Mol. Biol.* **356**(2), 367-381
34. Cartron, P.-F., Arokium, H., Oliver, L., Meflah, K., Manon, S., and Vallette, F. M. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**(11), 10587-10598

Legends of the figures

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

Figure 2: A) Laser confocal microscopy analyses of the subcellular localization of FLBax and flag-BaxΔC in resting (con) and etoposide-treated (apop) Du145 cells. The co-localization of the different

proteins with the mitochondrial protein (F_1-ATPase) was assessed using the Metamorph program (see Experimental procedures). As indicated on the histogram, both proteins were located in the cytosolic and in the mitochondrial fractions in resting cells and the induction of apoptosis triggered a significant translocation toward the mitochondria in both cases. Data obtained from 200 different cells in at least 5 independent fields. **B**) The presence of cytochrome c was determined in the cytosolic and in the mitochondrial fractions of FLBax or flag-BaxΔC transfected Du145 cells subjected or not to UV for 1 min then cultured for a further 36h. As shown in the illustrated experiment, cytochrome c was predominantly mitochondrial in untreated cells while in apoptotic cells most of the cytochrome c was present in the cytosol (see Experimental procedures). **C**) Analysis of the oligomerization of Bax by cross-linking in mitochondria isolated from flag-BaxΔC- and FLBax-expressing Du145 cells. Mitochondria isolated from apoptotic (UV 1 min) or control (untreated) cells were incubated with the different cross-linkers (DSS and EGS), using DMSO as a control. Complexes of Bax were then analyzed in 12% SDS-PAGE and immunoblotting. Monomeric Bax was assumed to migrate with an apparent molecular weight of 21 kDa, and dimeric Bax at 42 kDa while Bax oligomers of higher order at molecular weight ≥ 60 KDa. The immunoblots were reprobed with an antibody directed against the mitochondrial protein TOM22 to control that equal quantities of mitochondrial protein were loaded in all lanes (not shown). Immunoblots

are representative of at least 3 independent experiments.

Figure 3: A) Hela cells were transfected with GFP-Bax, GFP-BaxΔC, FLBax or flag-BaxΔC and the presence of the constructs analyzed and quantified as described in Experimental procedures. **B**) Influence of these constructs on the viability of the cells after a brief UV treatment (see Experimental procedures) was analyzed using Trypan blue exclusion. The data presented are the results after 36h incubation and are the mean of at least 3 independent experiments. **C**) Laser confocal microscopy analyses of the subcellular localization of GFP-FLBax and GFP-BaxΔC in transfected HeLa (see Experimetnal procedures). The localization of the different proteins was assessed using with the mitochondrial protein F_1-ATPase as control. Pictures show that both GFP constructs are localized to the mitochondria. Pictures are illustrative of at least 3 independent experiments.

Figure 4: A) HeLa cells were transfected with BaxΔC and the efficiency of the transfection analyzed by immunoblots with anti-Bax and anti-actin antibodies (left panel). Analysis of the oligomerization of Bax in the cytosol and in the mitochondria isolated from control and BaxΔC-transfected apoptotic cells was performed using different cross-linkers (DSS and EGS) and DMSO as a control. Bax complexes were analyzed by 12% SDS-PAGE and immunoblotting. The blots were washed and reprobed with an antibody against the mitochondrial protein TOM22 to control that equal amounts of mitochondrial protein

were loaded in all lanes (not shown). Immunoblots are representative of at least 3 independent experiments. **B**) The oligomerization of flag-BaxΔC was determined in the cytosol and in the mitochondria of UV-treated and untreated Du145 transfect cells by cross-linking followed by immunoblotting using an anti-flag antibody. Note that flag-BaxΔC formed no complexes in mitochondria after an UV-treatment. **C**) BN-PAGE and immunoblotting analyses Bax complexes present in mitochondria isolated from HeLa cells transfected with empty plasmid (mock) or FLBax in untreated (con) and UV-treated (apop) cells. For flag-BaxΔC, an anti-flag antibody was used. Immunoblots are representative of at least 3 independent experiments.

Figure 5: A) Different Bax constructs at a concentration of 8 fmol were incubated at 30° or 43°C or in the presence of 8 fmol rt-Bid then dimerization was analyzed in 12% SDS-PAGE as described in Experimental procedures. Monomers (M) and dimers (D) were defined by the apparent molecular (i.e. 21 kDa or 42 kDa). Illustrated experiments are representative of at least 3 independent experiments. **B**) Either IVT-FLBax was incubated with flag-FLBax (top left) or IVT-flag-FLBax was incubated with FLBax (right top) at different temperatures (30° and 43°C) or in the presence of BSA (-) or rt-Bid (t-Bid). The presence and the dimerization status of the flag-tagged construct were assessed after immunoprecipitation with anti-flag antibody and non-denaturating PAGE and phosphorImager analyses**.** Alternatively, IVT-BaxΔC was incubated with flag-FLBax (bottom

left) or IVT-flag-BaxΔC was incubated with FLBax (bottom right) under similar conditions as above. Note that the addition of the flag-tag did not interfere with the oligomerization of flag-FLBax with FLBax but that under no circumstances dimerization of IVT-BaxΔC or IVT-flag-BaxΔC was observed. Illustrated experiments are representative of at least 3 independent experiments.

Figure 6: A) A double hybrid assay in bacteria was performed as described in Experimental procedures to test the capacity of Bax Hα-9 to interact with itself. We used as a control the interaction of Bax BH3 domains with itself or with Bax Hα-1 (32). **B)** IVT-Bax constructs (FLBax, BaxΔC and RFP-Hα-9) were incubated at neutral (pH 7.4) or basic pH (pH 7.8), a condition under which both Bax (10) and Bcl-xL (31) oligomerization was triggered. The formation of dimers at basic pH was analyzed in the presence of the cross-linker DSS and analysed by SDS-PAGE and autoradiography. **C**) BaxΔC present in the cytosol of transfected Du145 cells were incubated in the presence of Triton X-100 and the formation of dimers analyzed in 12% SDS-PAGE and immunoblot with anti-Bax antibodies (see experimental procedures).

Supplementary data

Figure S1:

Du145 cells transfected with FLBax or BaxDC were cultivated in the presence of STS as described in experimental procedures. Time-lapse video-microscopy experiments were performed using a Zeiss Axiovert 200-M inverted microscope, according to the manufacturer's protocol. 24-well plates were placed inside

an Incubator XL-3, on a heating insert M06 (37°C) topped with a CO2-cover HM connected to a CO2 controller that maintained environmental CO2 concentration at 5% for the duration of filming. Digital pictures were acquired and saved every 10 minutes over 48h using an AxioCam MRm digital camera and the AxioVision software, applying a 10x magnification. Applying the AxioVision conversion module, the series of photographs were displayed as continuous time-lapse movies prior to analysis.

S1A: DU 145 FL Bax untreated cells
S1B: DU 145 FL Bax STS treated cells
S1C: DU145 BaxΔC untreated cells
S1D: DU 145 BaxΔC STS treated cells

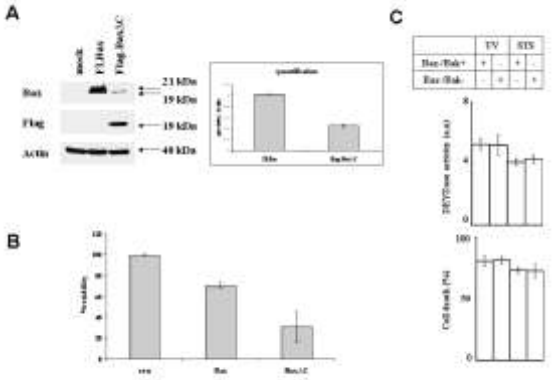


Figure 1: Er et al.

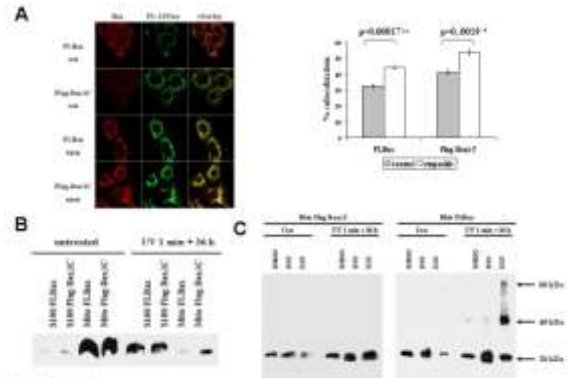


Figure 2: Er et al.

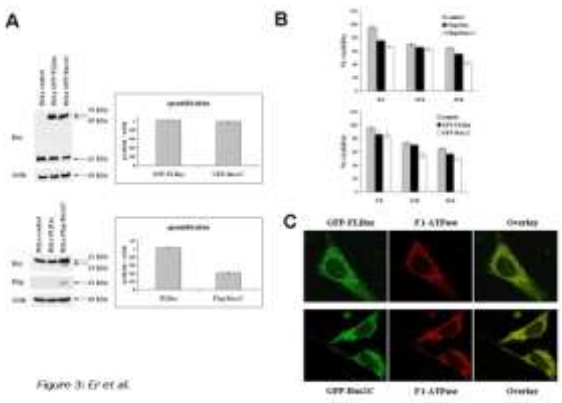


Figure 3: Er et al.

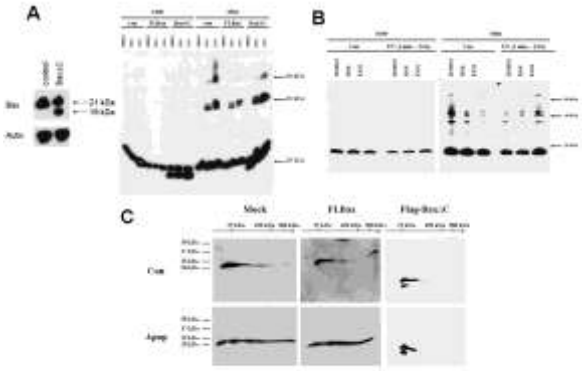


Figure 4: Er et al.

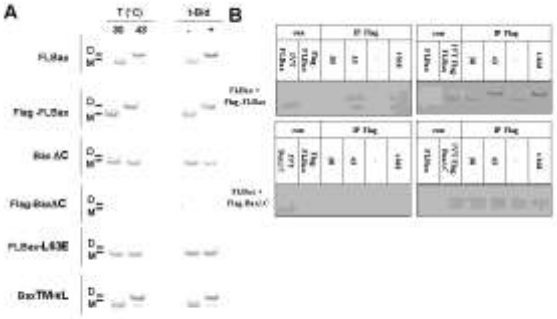


Figure 5: Er et al.

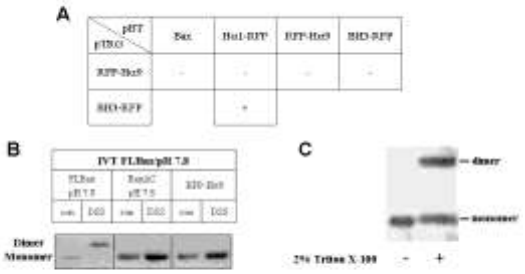


Figure 6: Er et al.

II. TOM22 EST UN RÉCEPTEUR MITOCHONDRIAL DE BAX.

La deuxième partie de ma thèse a consisté à identifier des partenaires mitochondriaux de la protéine Bax. Des travaux préliminaires réalisés au sein du laboratoire par Cartron et coll. (2004a) nous ont orientés dans notre recherche. Afin d'identifier des partenaires putatifs interagissant avec l'hélice α1 de Bax, une banque d'ADNc de cerveau humain a été criblée par un système de double-hybride bactérien décrit précédemment (Cartron *et al.,* 2004a). La protéine TOM22 (données non montrées), ainsi que les protéines à BH3 seulement PUMA et Bid rapportées précédemment (Cartron *et al.,* 2004a) ont été identifiées au cours de ce criblage. TOM22, ainsi que TOM40, sont des protéines du complexe TOM (**t**ranslocase of the **o**uter **m**itochondrial membrane) (figure 38), structure impliquée dans la translocation vers la mitochondrie de protéines codées par le génome nucléaire (Ahting *et al.,* 2001). TOM22 est aussi un récepteur pour des protéines ne possédant pas de pré-séquence d'adressage mitochondrial conventionnel (Truscott *et al.,* 2003) et possède un large domaine cytosolique sensible à la protéolyse (van Wilpe *et al.,* 1999 ; Saeki *et al.,* 2000).

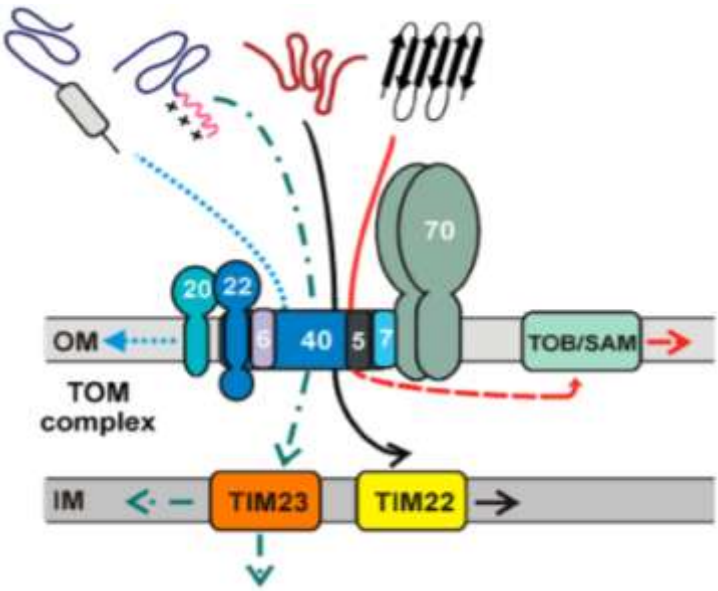


Figure 38 : Le complexe TOM (figure tirée de Rapaport, 2005). Le complexe TOM permet la translocation de protéines précurseurs mitochondriales. Après avoir traversé la membrane mitochondriale externe (OM, Outer Membrane), les protéines précurseurs contenant une pré-séquence sont engagées dans la membrane mitochondriale interne (IM, Inner Membrane) par le complexe TIM23, alors que les protéines polytopiques de la membrane interne sont insérées par le complexe TIM22. Les précurseurs en tonneau β traversent la membrane externe par le complexe TOM et s'insèrent dans la membrane externe *via* le complexe TOB/SAM. Le complexe TOM contient 7 sous-unités : les récepteurs primaires TOM20 et TOM70 et le complexe coeur TOM qui comprend TOM5, TOM6, TOM7, TOM22 et TOM40. Le nom des sous-unités TOM reflète leur masse moléculaire apparente.

Afin d'identifier les partenaires mitochondriaux de Bax, j'ai employé deux méthodes : le pontage moléculaire (ou cross-linking) sur des fractions mitochondriales d'extraits de cellules et les gels bidimensionnels (gels natifs en bleu de Coomasie suivis des gels SDS-PAGE et western-blots correspondants). J'ai ainsi identifié TOM22 comme partenaire d'interaction avec la protéine Bax (expériences de pontage moléculaire ou cross-linking) (voir § suivant et figure 39) et comme faisant partie d'un complexe moléculaire impliquant la protéine Bax (expériences de gels bidimensionnels) (voir **article 2** : Bellot *et al.,* soumis, **figure 2D**).

Après fractionnement cellulaire de cellules HeLa irradiées (traitement : UV 1 min + 12 h), nous avons récupéré les fractions mitochondriales (MITO) et cytosoliques (S100). 50 µg de MITO ont été incubé 45 min à température ambiante en présence de 2 mM de cross-linker (DSS ou EGS). Pour la réaction contrôle, j'ai ajouté du DMSO sans cross-linker (car les cross-linker ont été dilués dans le DMSO). La réaction est ensuite quenchée en rajoutant du Tris-HCl (pH 7,5) à la concentration finale de 25 mM et en incubant 15 min à température ambiante. Du bleu de dépôt 2 x est ensuite rajouté aux échantillons. Les échantillons sont déposés sur un gel SDS-PAGE 12 % et le gel est mis à migrer à courant constant puis est transféré sur une membrane PVDF. Les membranes sont saturées, incubées avec l'anticorps primaire Bax (DakoCytomation) ou TOM22 (Sigma), puis avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase. Les signaux sont révélés par chimioluminescence.

Les résultats obtenus sont illustrés figure 39. On observe que la protéine Bax est présente sous forme monomérique (21 kDa) dans tous les cas (avec ou sans cross-linker). Mais elle est aussi présente dans un complexe d'environ 44 kDa et dans un complexe de 66 kDa en présence de cross-linker (DSS ou EGS 2 mM). On observe la même chose pour la protéine TOM22 (forme monomérique de 22 kDa et formes oligomérisées d'environ 44 et 66 kDa). Ces observations indiquent que Bax et TOM22 oligomérisent en condition apoptotique. Deux hypothèses se révèlent alors : soit les protéines Bax et TOM22 forment des homo-oligomères, soit elles forment des hétéro-dimères (Bax/TOM22 ou Bax/protéine inconnue d'environ 20 kDa et TOM22/protéine inconnue d'environ 20 kDa). Nous avons vu précédemment que Bax est capable de s'homo-oligomériser (voir **§ I** de la partie Résultats de ce manuscrit). Il est probable donc que les oligomères observés sur la figure 39 correspondent à des homo-oligomères de Bax (partie Cross-linking Bax). Mais nous verrons aussi dans la suite que Bax est capable d'interagir avec la protéine TOM22 (voir **article 2** : Bellot *et al.,* soumis, **figure 2B**). Il est donc aussi probable que les oligomères observés sur la figure 39 (partie Cross-

linking TOM22) correspondent à des hétéro-dimères Bax/TOM22 et à des hétéro- trimères Bax/Bax/TOM22.

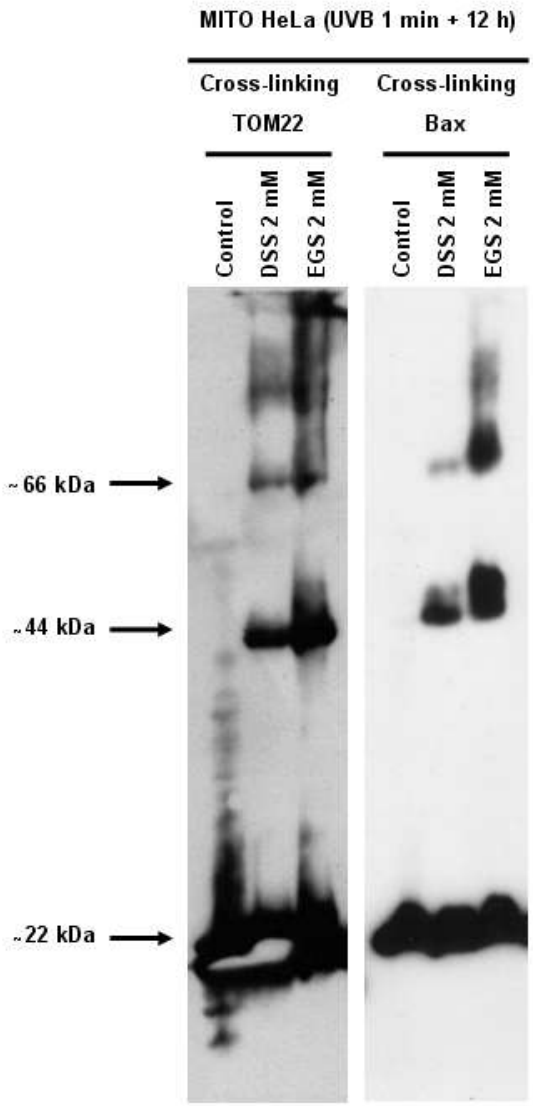


Figure 39 : Cross-linking de Bax et de TOM22 dans les extraits mitochondriaux (MITO) de cellules HeLa irradiées (1 min UV + 12 h).

Article 2

Cell Death Differ. 2007 Apr;14(4):785-94

TOM22, a core component of the mitochondria outer membrane protein translocation pore, is a mitochondrial receptor of Bax.

Gregory BELLOT, Pierre-François CARTRON, Emine ER, Lisa OLIVER, Philippe JUIN, Stephen MANON, François M. VALLETTE.

Article sous presse dans *Cell Death and Diffenciation.*

Dans cet article, j'ai réalisé les gels bidimensionnels (gels natifs en bleu de Coomasie et les gels SDS-PAGE et western-blots correspondants). Les expériences dans la levure ont été réalisées par Stephen Manon. Lisa Oliver a réalisé les analyses de microscopie confocale et a contribué à la réalisation des expériences de peptide scan et de transfection cellulaire. Gregory Bellot a réalisé les transfections cellulaires, les fractionnements cellulaires et les expériences de cartographie épitopique (peptide scan). Gregory Bellot et Pierre-François Cartron ont réalisé les tests acellulaires, les expériences de transcription/traduction *in vitro*, d'immunoprécipitation et de pontage moléculaire (cross-linking). Pierre-François Cartron a réalisé les expériences de double-hybride bactérien. Enfin, Philippe Juin a réalisé les expériences de micro-injection. L'ensemble de ces travaux a été dirigé par François M. Vallette.

Dans cette étude, nous avons identifié la protéine TOM22, un récepteur pour les protéines mitochondriales codées par le génome nucléaire, comme un récepteur de l'hélice α1 de Bax. L'inhibition de cette interaction interfère avec l'adressage de Bax à la mitochondrie ainsi que son activité apoptotique, soulignant ainsi l'importance de cette interaction dans la mort cellulaire.

Nous montrons tout d'abord que l'interaction de Bax avec la mitochondrie est sensible à la protéolyse. Cette interaction est augmentée par une activation par tBid et devient moins sensible à la protéolyse (**figure 1B**). Par ailleurs, nous montrons que l'hélice α1 de Bax fusionnée à la protéine fluorescente rouge (Hα1-RFP) est sensible au traitement protéolytique, alors que l'hélice α9 de Bax fusionnée à la RFP (RFP-Hα9) n'est jamais retrouvée associée à

la mitochondrie (**figure 1B**). Ces résultats suggèrent que Bax interagit avec la mitochondrie *via* son hélice α1 qui interagirait avec une ou des protéines mitochondriales et que cette interaction est transitoire (puisqu'elle n'est plus sensible à la protéolyse après insertion mitochondriale).
Au cours d'un criblage d'une banque d'ADNc de cerveau humain par un double-hybride bactérien, nous avions trouvé TOM22 comme partenaire d'interaction avec l'hélice α1 de Bax (Hα1-RFP) (données non montrées), mais pas avec RFP-Hα9. Notons qu'au cours de ce criblage, nous avions aussi identifié PUMA et Bid comme partenaires d'interaction avec l'hélice α1 de Bax (Cartron *et al.,* 2004a).
L'ensemble de ces données suggéraient que TOM22 est un récepteur mitochondrial putatif de Bax. Nous confirmerons par la suite cette interaction par des tests acellulaires et *in vitro*.

Une expérience de cartographie épitopique nous a permis de montrer qu'un anti-corps anti-TOM22 reconnaît une séquence centrale (KTGALLLQ) au niveau de l'hélice α1 de Bax ainsi qu'une séquence au niveau de la boucle entre les hélices α5 et α6 (LCTKVPEL) (**figure 2A**), ces régions étant connues pour être impliquées dans l'adressage et l'insertion de Bax à la mitochondrie (Heimlich *et al.,* 2004 ; Cartron *et al.,* 2005). De façon intéressante, une interaction plus faible a été observée avec l'hélice α9 et les 2 régions flanquant le domaine BH3 de Bax (**figure 2A**). En outre, nous n'observons qu'une faible interaction de Bax avec VDAC (Voltage Dependent Anionic Channel) dans nos conditions expérimentales (**figure 2A**).

Cette interaction a aussi été confirmée par des expériences de pontage moléculaire où l'hélice α1 de Bax et Bax ψ migrent à un poids moléculaire faisant penser à une interaction TOM22/Bax et TOM22/Bax ψ respectivement, alors qu'aucune différence de migration n'est observée avec RFP-Hα9 ΔS184 (**figure 2B**). Ces dernières hypothèses ont été confirmées par immunoprécipitation (**figure 2B**). En outre, afin de confirmer ce type d'association en condition plus physiologique, nous avons effectué des immunoprécipitations avec des extraits de cellules de GBM (glioblastome multiforme) traitées ou non à la staurosporine (STS). Nous pouvons ainsi observé que TOM22 est associé à TOM40 en condition normale, mais en condition apoptotique, TOM22 s'associe à Bax (**figure 2C**).

Ensuite, nous avons utilisé la méthode des gels natifs (BN-PAGE, blue natif polyacrylamide gel electrophoresis) afin d'étudier l'organisation des protéines mitochondriales et d'examiner

les complexes formés par Bax et TOM22 au cours de l'apoptose dans les cellules HeLa (**figure 2D**). Dans les mitochondries des cellules non traitées, la vaste majorité du Bax endogène est présente dans un complexe de faible poids moléculaire, ce qui correspondrait à une forme monomérique. La protéine TOM22 est retrouvée dans un complexe de haut poids moléculaire (≥ 900 kDa) dans les mêmes conditions. Nous pouvons noter cependant qu'une fraction de TOM22 co-migre avec Bax. 12 h après induction de l'apoptose par les UV (1 min de traitement), Bax se réorganise dans des complexes de haut poids moléculaire (de 20 à ≥ 900 kDa). De façon intéressante, TOM22 observe un schéma similaire. Remarquablement, après 24 h, Bax est présente dans deux types de complexes de 20 kDa et 900 kDa, alors que TOM22 est présente majoritairement dans un complexe de 450 kDa. Ces résultats suggèrent que l'association de Bax avec TOM22 a lieu à un stade précoce de l'apoptose et est transitoire puisque cette interaction n'est plus détectable à un stade plus avancé. Des expériences de pontage moléculaire à différents temps montrent des résultats similaires (**figure S1**).

Par la suite, nous montrons que la saturation de mitochondries de foie de rat avec un anticorps anti-TOM22 inhibe spécifiquement l'association de Bax activée avec la mitochondrie, alors que d'autres anticorps n'ont aucun effet (**figures 3A et 3B**). Des résultats similaires ont été obtenus avec Bax ψ, alors que l'association de BaxΔS184 à cet organelle n'a été affecté par aucun des anticorps testés.

Par ailleurs, la micro-injection d'anticorps anti-TOM22 dans des cellules de gliome de rat A15A5 exprimant Bax inhibe de manière dose dépendante l'apoptose induite par la staurosporine (STS) (figure S2). D'autre part, la micro-injection d'anticorps dirigés contre d'autres protéines mitochondriales, notamment TOM20, la metaxine 1 et le PBR (peripheral benzodiazepine receptor), n'interfèrent pas avec l'apoptose induite par la staurosporine (**figure 3C**). Nous possédons au laboratoire des lignées de cellules humaines de glioblastome multiforme exprimant [Bax (+) GBM] ou non [Bax (-) GBM] la protéine Bax. La micro-injection d'un anticorps anti-TOM22 dans ces cellules nous permet d'observer que les anticorps anti-TOM22 inhibent l'apoptose induite par la staurosporine des cellules Bax (+) GBM de manière significative, mais pas des cellules Bax (-) GBM (**figure 3D**). L'ensemble de ces résultats suggèrent que TOM22 est un récepteur mitochondrial de Bax et est essentiel à son activité apoptotique.

Nous avons généré des cellules déficientes en TOM22 par une stratégie anti-sens (cellules TOM22-AS) et avons étudié la localisation subcellulaire de Bax dans ces cellules traitées ou non à la staurosporine, par fractionnement cellulaire (**figure 4C**) et par microscopie confocale (**figure S4**). Ces deux méthodes indiquent que Bax est transloquée à la mitochondrie après induction de l'apoptose, et cette translocation est fortement inhibée dans les cellules TOM22-AS. De plus, l'absence de TOM22 réduit considérablement la mort cellulaire induite par la staurosporine des cellules Bax (+) GBM, qui atteint un niveau similaire à la mort cellulaire des cellules Bax (-) GBM traitées à la staurosporine (**figure 4D**). Ces résultats viennent conforter les résultats obtenus par micro-injection. Notons que la diminution de l'expression de TOM20 (cellules TOM20-AS) n'affecte pas l'apoptose induite par la staurosporine (figure 5), suggérant la spécificité de l'interaction TOM22/Bax. De plus, l'association de Bax ψ, mais pas de BaxΔS184, est fortement inhibée dans les cellules TOM22-AS (**figure 6**), suggérant que ces deux formes mitochondriales de Bax ont des sites de fixation différents au niveau de la mitochondrie.

Enfin, nous montrons que des cellules de levure haploïde pour TOM22 présentent une diminution de l'expression de TOM22 et une diminution de l'association de Bax avec la mitochondrie (**figure 7**). Ces données suggèrent que TOM22 est aussi requise à l'association de Bax aux mitochondries.

L'ensemble de ces données suggèrent que TOM22 est un récepteur mitochondrial de Bax et que cette interaction implique l'hélice α1 de Bax. L'inhibition fonctionnelle de cette interaction interfère avec l'adressage de Bax aux mitochondries et par conséquent avec l'apoptose.

Article 2

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*], Emine ER [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 [1,2°]

[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 a 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 Baxdependent 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 pre-treatment (**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 NT 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. We used Bax ψ, Hα1-RFP and RFP-Hα9 ΔS184 but with 2 different crosslinkers (either EGS or DSS). As shown in **Fig. 2B**, 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. 2B**) 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. 2B**, 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. 2C**). On the other hand, Bcl-2 was co-immunoprecipitated with Bax in resting cells and in apoptotic cells (**fig. 2C**). Of note, the specificity of this experiment was provided by the observation that VDAC, an abundant protein of the outer membrane of mitochondria, was not immunoprecipitated by anti TOM22 antibodies under our conditions. Next, we used Blue native gel electrophoresis, a method which has been extensively used for the qualitative study of mitochondrial proteins organization, to examine the complexes formed by Bax and TOM 22 during UV induced apoptosis in Hela cells (**Fig. 2D**). In mitochondria of untreated cells, the vast majority of endogenous Bax was present in a major low molecular weight complex which is likely to correspond to monomers. TOM 22 was found in a complex of high molecular (≥ 900KDa) under the same conditions. Of note, a small proportion of TOM22 appears nonetheless to comigrate with Bax. 12 hr after the induction of apoptosis, Bax was organized in complexes of higher orders with molecular weights ranging from 20 KDa to ≥900 KDa. Quite remarkably, TOM 22 exhibited a similar pattern. After 24 hr, Bax was mostly present in two complexes of 20 KDa and 900 KDa while TOM 22 was for the most part present in a 450 KDa complex. These results suggest that the association of Bax with TOM22 is massive at the early stage of apoptosis but transient as it broke down at latter stage. A time course assay in a cell free assay where IVT Bax was cross linked to mitochondria gave similar results (**Fig. S1**).

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. S2**). 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 in Bak [Bak (-) 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)**. Of note, Bak seems to have little or no effect on TOM22 dependent apoptosis as shown by similar experiments performed in Bak (-) GBM cells (**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, fulllength 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 to the same extent than that observed in TOM20-AS-treated GBM cells (**Fig. 4A**) and the viability of these cells was reduced unless cultured in the presence of high levels of glucose (**Fig. S3**). 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. S4**). 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 S4**). Of note, no changes in the subcellular localization of Bcl-2, Bcl-Xl and Bak were observed in TOM22- AS cells (**Fig. S4**), 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 although it affect similarly the import of a reporter mitochondrial protein (**Fig. 5**). This result suggests that the effect of TOM22 antisense on Bax association with mitochondria is specific. 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 TOM22, 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**). Of course, we cannot eliminate the possibility that other proteins whose mitochondrial targeting is dependent on Tom22 specifically affect Bax translocation and apoptosis. 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 crosslinking 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 Baxoligomer 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 (2x106) 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 microcapillaries (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-PEG500-UC540 membrane using a MultiPep peptide synthesizer (Intavis AG, Cologne, Germany) at a loading capacity of 400 nmol/cm2. 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% H2O. TFA was removed and the membrane rinsed with dichloromethane, followed by ethanol and then H2O. 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-T174D [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 westernblot analysis [40].

*Blue Native PAGE***.** Blue native PAGE (BN-PAGE) was performed essentially as described in http://www.hos.ufl.edu/clineweb/Protocols/BNgel.htm. Briefly, mitochondrial membranes were suspended at 0.8mg/mL in imidazole/HCl buffer (pH 7.0) containing 50mM NaCl and 5mM ε-aminocaproic acid. Digitonin-solubilization was done for 20 minutes on ice at a detergent/protein ratio of 3 (w/w). Unsolubilized material was sedimented (21,000g, 20 minutes) and discarded. The supernatant was supplemented with Coomassie dye solution (5% Serva Blue G in 750mM ε-aminocaproic acid) to a dye/protein ratio of 0.2 (w/w) and separated on a linear gradient (5-14%) polyacrylamide slab gel. Molecular weight markers were treated in a similar manner before loading on the gel.

Second dimension electrophoresis was done on each individual lane from the BN-PAGE. Lanes were excised and incubated in the dissociating solution (1% SDS, 1% β-mercaptoethanol) for 3 hours at room temperature. The lane was layered on the top of a glycine-SDS-12.5% polyacrylamide gel. After migration, proteins were blotted on PVDF membranes (ProBlott, Applied Biosystems). Antibodies directed against Bax (N20, Santa-Cruz), Tom22 (Santa-Cruz) and Tom40 (Santa-Cruz) were used at 1/2000°, 1/500° and

1/500° dilutions, respectively. HRP-coupled secondary antibodies (Jackson Laboratories) were used at 1/5000°. Peroxidase activity was revealed with ECL+ (Amersham).

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 Cterminus 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 antihuman 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 antihuman 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)** Cross-linking experiments were performed after the incubation of IVT 35S-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. **C)** 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, anti-Bax or anti- TOM20 antibodies. We use as a control the immunoprecipitation of TOM20 by anti TOM20. 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. **D)** Apoptosis was induced by a brief UV treatment of Hela cells and cells were collected and mitochondria obtained after cell fractionation, as described in ref 5, 12 hr and 24 hr after induction. Blue native gels were performed on Hela isolated mitochondria and the membranes were immunoblotted with anti Bax or anti TOM22 antibodies as described in materials and methods.

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 or not Bax and Bak [Bax (+) Bak (+); Bax (+) Bak (-); Bax (-) Bak (+) and Bak (-) 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 (+) Bak (+) 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 with antisense TOM20 on day 5. Correlation factors (CF) were calculated as described in Cartron et al. (5) and indicate that the importation of preCoX VIII was similarly affected in TOM 22 and TOM 20 antisense treatments. **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) and the percentage of trypan blue-positive cells. 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.

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 of more than 100 cells from 5 different cells as described in ref 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. The pictures are representative of at least 100 different 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-T174D (**C**). Baxexpression was achieved for 14 hours for Bax α (**B**) and at the indicated times for Bax- T174D (**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 BaxT174D 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: 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 (note that similar results were ontained wit hEGS cross linker) 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. 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. 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

Figure S2: 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 S3: 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 S4: 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.

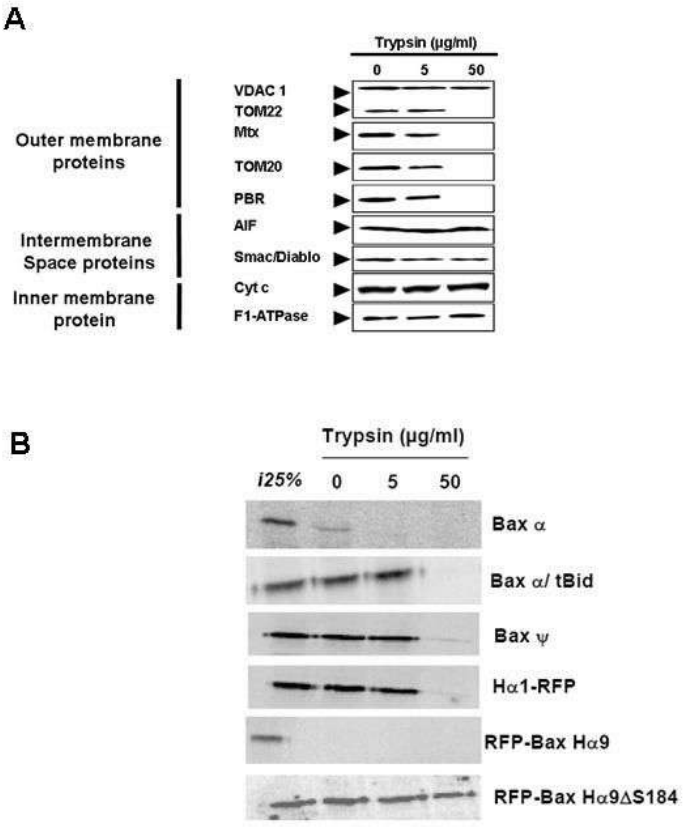


Fig. 1 Bellot *et al*.

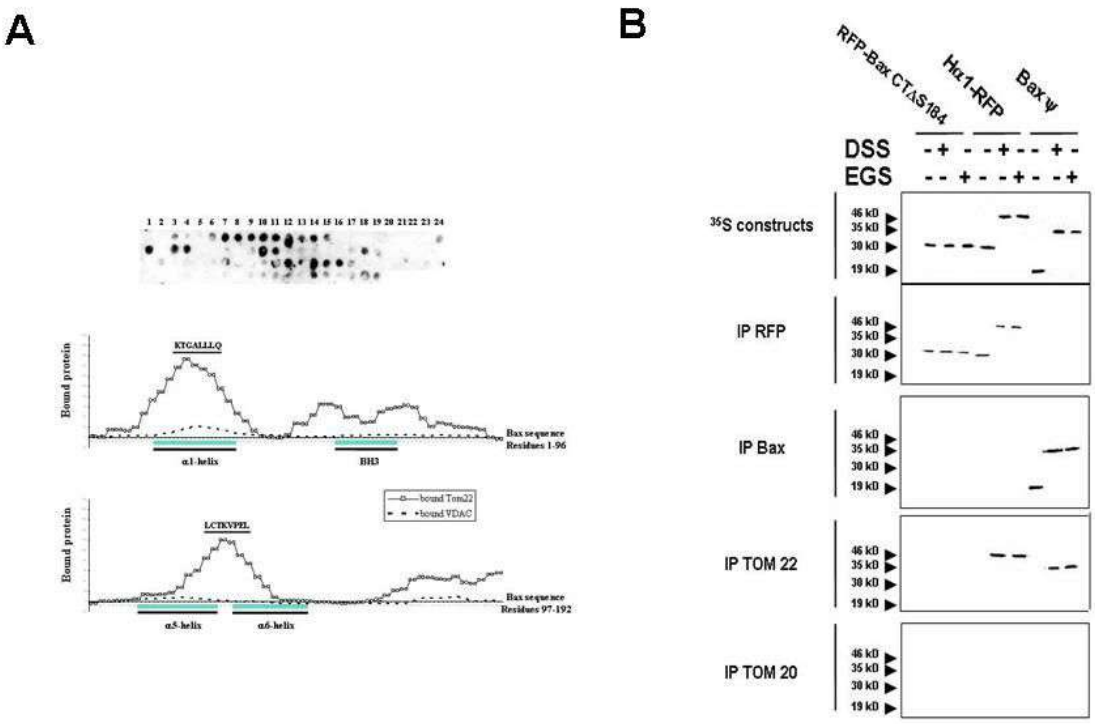


Fig. 2 A,B Bellot *et al*.

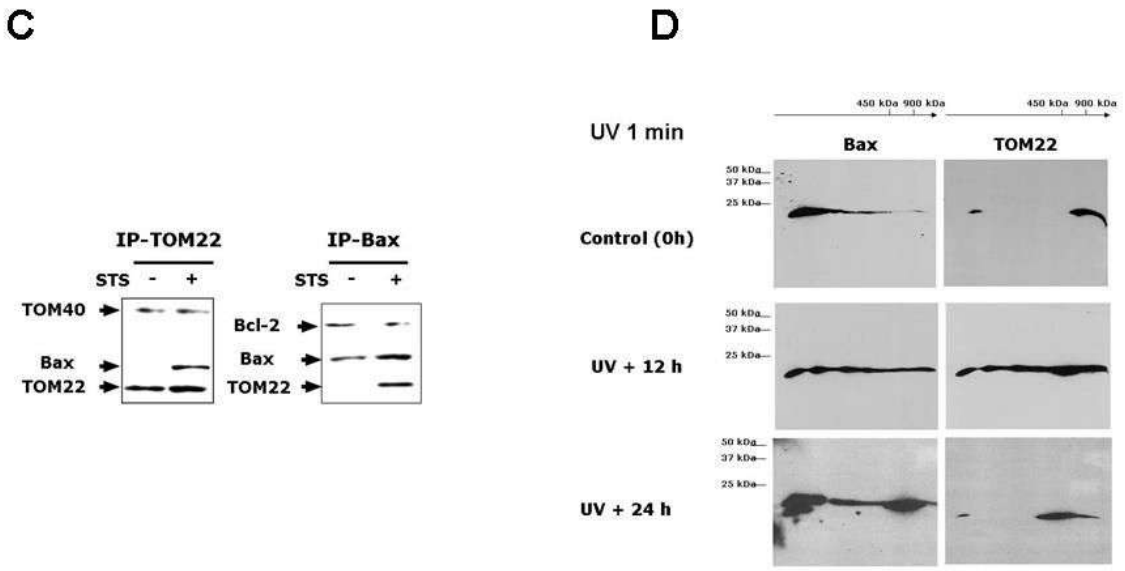


Fig. 2 C,D Bellot *et al.*

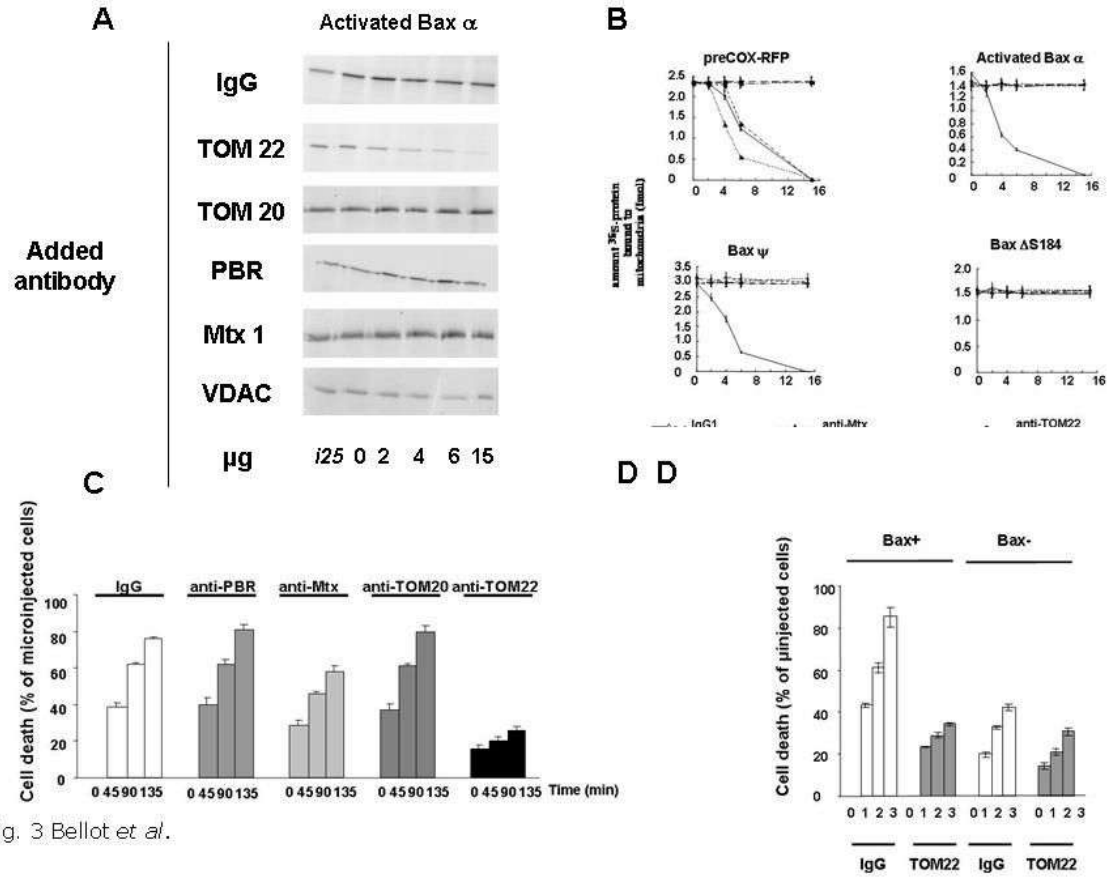


Fig. 3 Bellot *et al*.

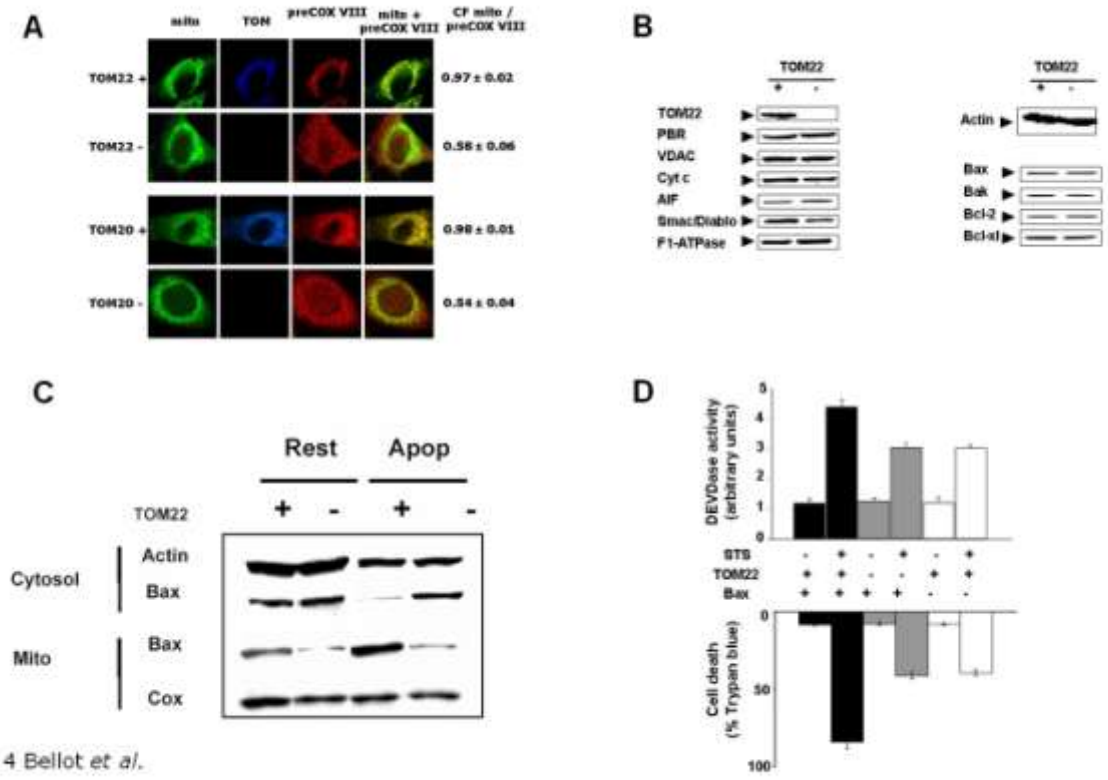


Fig. 4 Bellot *et al.*

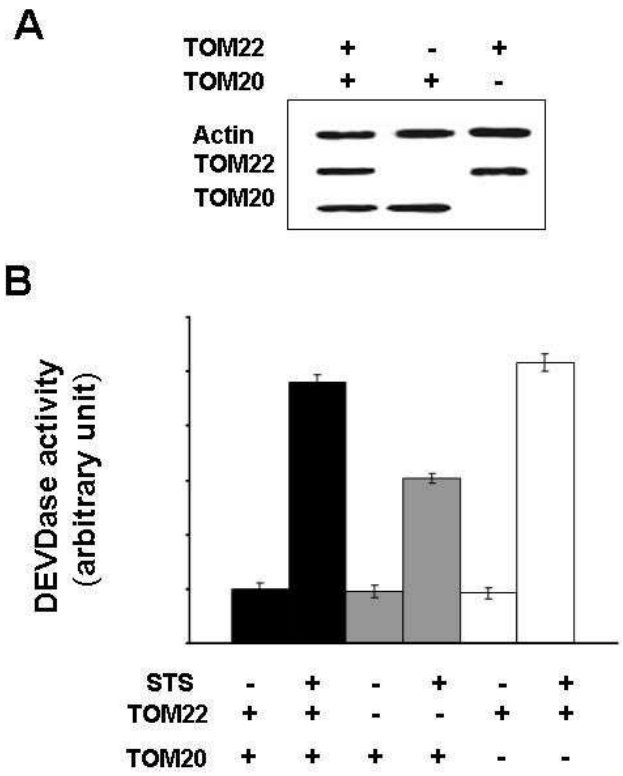


Fig. 5: Bellot *et al*.

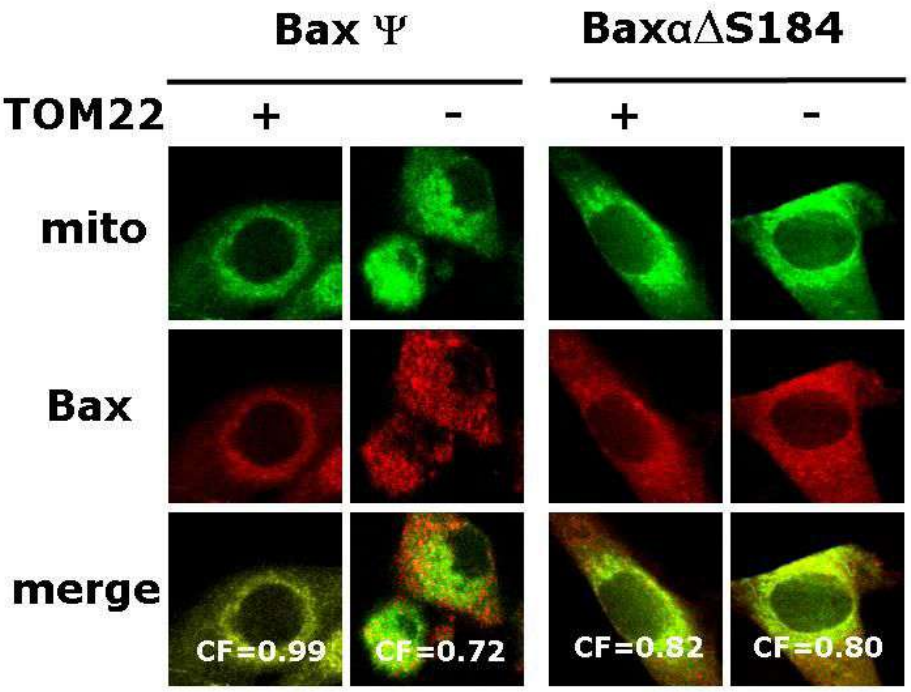


Fig. 6 Bellot *et al*.

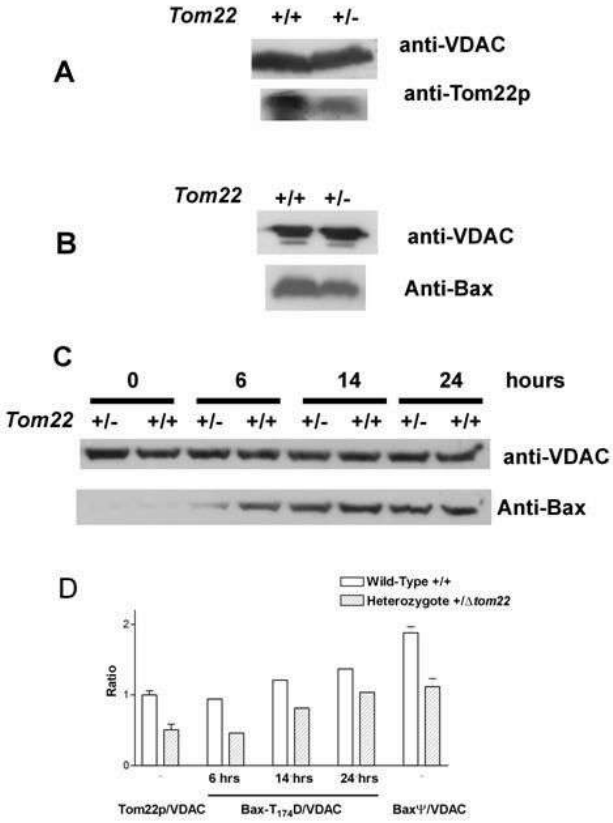


Fig. 7 Bellot *et al*.

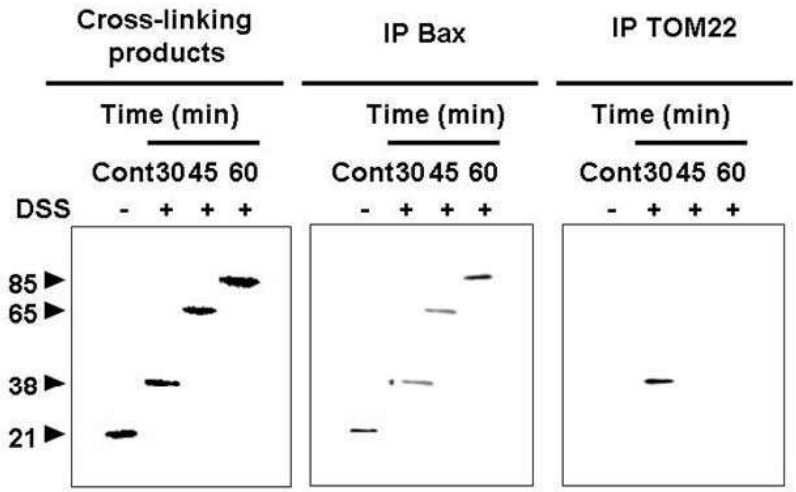


Fig. S1 Bellot *et al.*

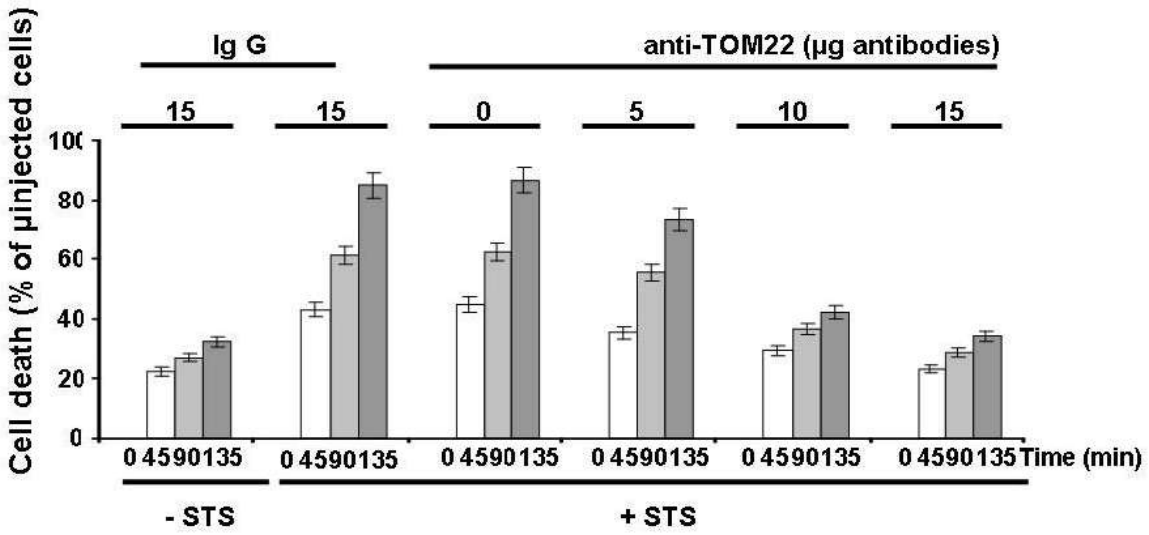


Fig. S2 Bellot *et al.*

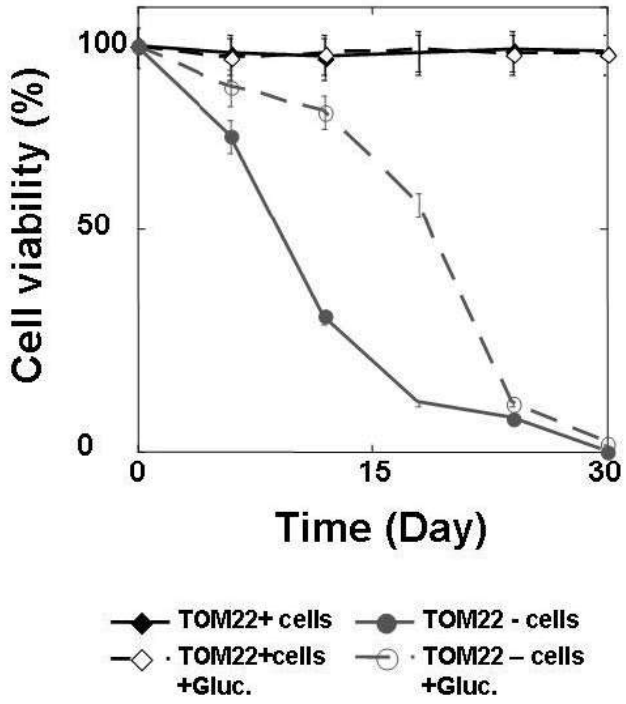


Fig. S3 Bellot *et al*.

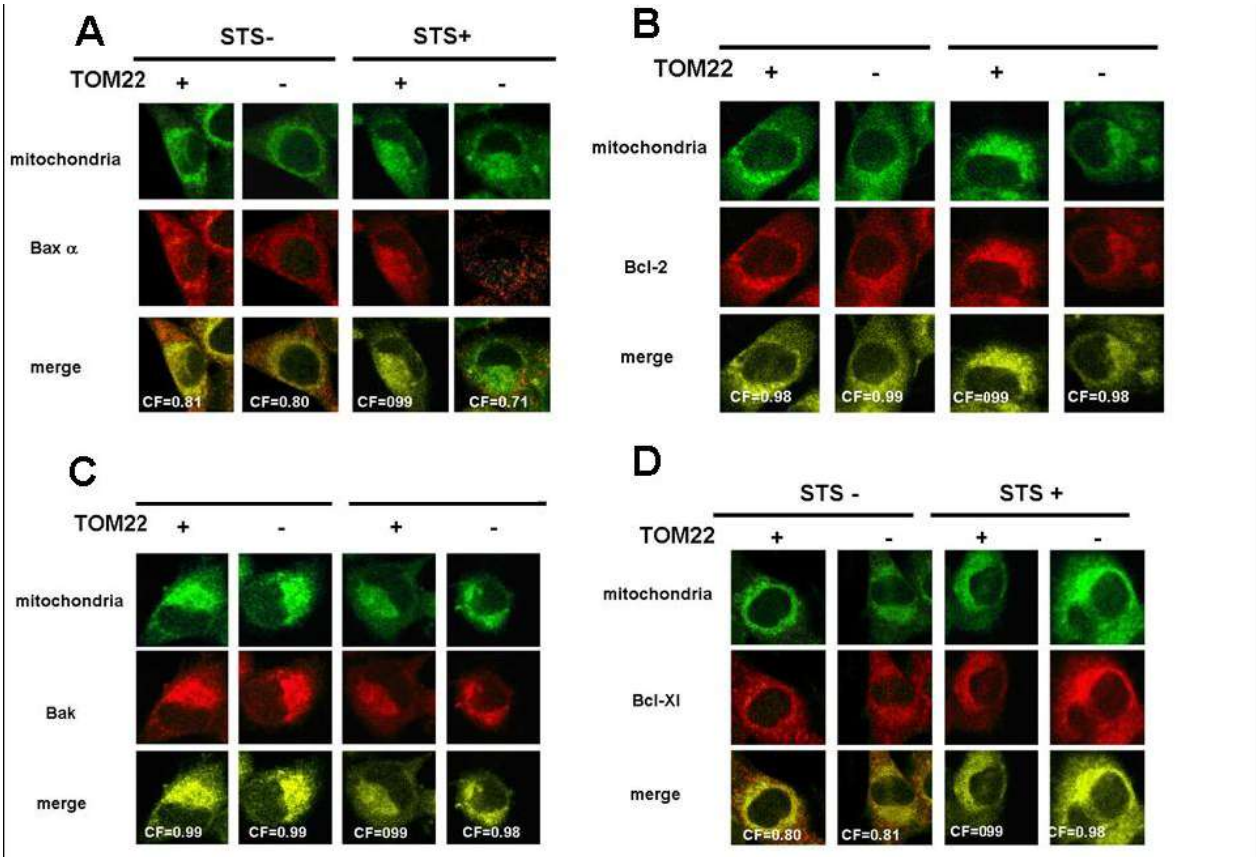


Fig. S4 Bellot *et al*.

III. PURIFICATION DE LA PROTÉINE PRO-APOPTOTIQUE BAX.

La troisième partie de ma thèse a consisté à mettre au point un protocole de purification de la protéine pro-apoptotique Bax afin d'étudier sa structure dans des bicouches lipidiques. Les études de structures devaient être réalisées en collaboration avec le laboratoire de Résonance Magnétique Nucléaire de la Matière Condensée dirigé par le Professeur Burkhard Bechinger à l'ISIS à Strasbourg.

De nombreuses études concernant la purification de Bax (forme entière ou tronquée) ont été réalisées (Lewis *et al.,* 1998 ; Montesuit *et al.,* 1999 ; Antonsson *et al.,* 2000 ; Eliseev *et al.,* 2004). Cependant, aucune étude structurale de cette protéine n'a été effectuée en bicouche lipidique. Or il serait intéressant de pouvoir connaître quelle serait la conformation de la protéine Bax dans des membranes, vu que cette protéine exerce son activité en s'insérant dans la membrane mitochondriale externe. C'est pourquoi, nous nous sommes penché sur le sujet et avons décidé de mettre au point un protocole de purification de Bax afin de transposer ce protocole pour produire cette protéine en intégrant dans le milieu de culture des bactéries des nutriments marqués (au niveau des apports carbonés ou azotés), ce qui permettrait ensuite l'étude RMN de cette protéine. Pour cela, il était indispensable de passer par une étape de choix de plasmide et de la souche bactérienne la plus optimale pour la production.

Le plasmide pDEST 17 Bax est celui décrit dans Cartron *et al.,* (2002a). Brièvement, Bax a été sous-cloné dans le vecteur pDEST 17 par le système Gateway (Invitrogen) (voir partie Matériels et Méthodes) en suivant les recommandations du fournisseur. La première étape est une PCR avec les oligonucléotides suivants : l'oligonucléotide sens Bax (5'P-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CAT GGA CGG GGA GCA GCC CAG AGG CGG G-3'P) et l'oligonucléotide anti-sens BaxC (5'P-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT TCA GCC CAT CTT CCA GAT GGT GAG CGA GGC GGT GAG CA-3'P). Ce plasmide permet l'expression de notre protéine d'intérêt avec un tag 6 x Histidine en N-terminal dans des cellules bactériennes en présence d'ARN polymérase T7. La carte de cette construction pDEST 17 Bax est illustrée figure 40.

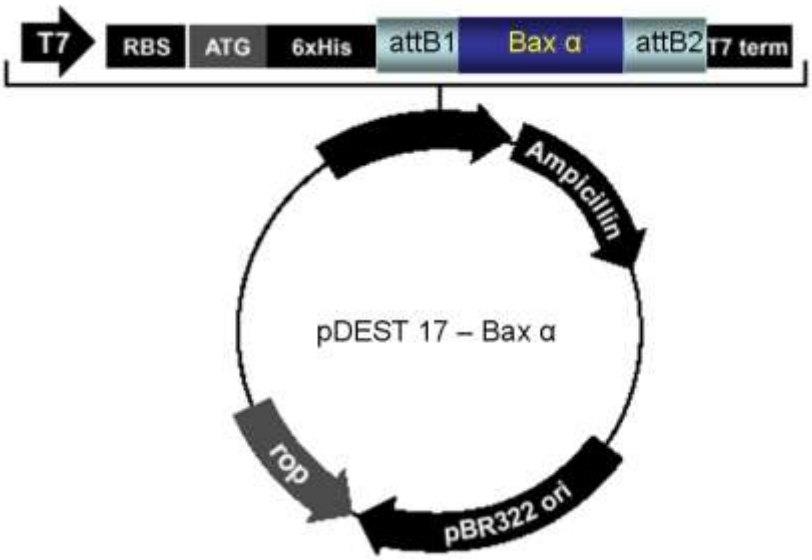


Figure 320 : Carte du plasmide pDEST 17 Bax. T7 : promoteur ARN polymérase T7 ; RBS : ribosome binding site ; ATG : codon initiateur ; 6xHis : tag 6 x Histidine ; attB1 et attB2 : sites de recombinaisons (inhérents à la technique de clonage) ; T7 term : terminateur de l'ARN polymérase T7 ; Bax α : séquence d'ADNc du gène *bax*.

Afin d'effectuer l'expression et la purification de la protéine Bax, nous disposions au laboratoire de la souche bactérienne *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS. Cette souche peut être utilisée pour la production de protéines dont les gènes sont placés sous le contrôle du promoteur T7, comme c'est le cas pour notre plasmide pDEST 17 Bax, et est recommandée pour l'expression de protéines toxiques. La désignation DE3 signifie que la souche contient le lysogène λDE3 qui porte le gène codant pour l'ARN polymérase T7 sous le contrôle du promoteur *lac*UV5 (voir figure 41). L'IPTG est nécessaire pour induire l'expression de l'ARN polymérase T7. Cette souche d'*E. coli* est B/r et ne contiennent pas la protéase codée par le gène *lon*. Elle est aussi déficiente pour OmpT, une protéase de la membrane externe. L'absence de ces deux protéases réduit la dégradation des protéines hétérologues exprimées dans cette souche. BL21(DE3)pLysS et BL21(DE3)pLysE (souche utilisée ultérieurement dans ce chapitre) portent respectivement les plasmides pLysS et pLysE qui produit la lysozyme T7. Le plasmide pLysS portée par la souche BL21(DE3)pLysS produit la lysozyme T7 qui inhibe l'ARN polymérase T7, réduisant ainsi l'expression basale du gène d'intérêt. Ainsi, le plasmide pLysS stabilise la présence du plasmide contenant le gène cloné dans la bactérie car la quantité de protéine produite est plus faible. Le lysozyme a aussi une autre fonction : elle détruit la paroi *d'E. coli* en coupant une liaison spécifique du peptidoglycane favorisant ainsi la lyse bactérienne. Le plasmide pLysE porté par la souche BL21(DE3)pLysE

produit plus de lysozyme T7 que pLysS, contrôlant encore plus finement l'expression basale de la protéine hétérologue. pLysS, tout comme pLysE, confère la résistance au chloramphénicol (Cam^R) et contient l'origine p15A. Cette origine permet à pLysS ou pLysE d'être compatible avec les plasmides contenant l'origine ColE1 ou pMB1 (par exemple les plasmides dérivés de pUC ou pBR322).

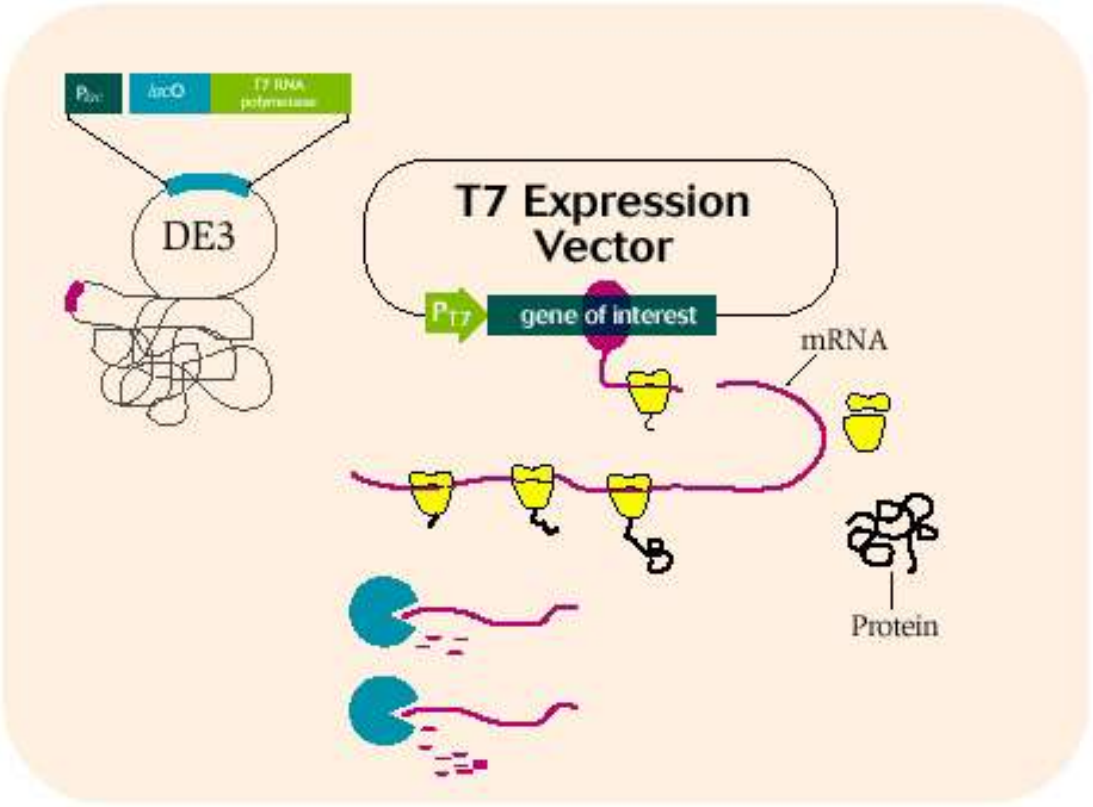


Figure 41 : Représentation schématique d'une souche d'*E. coli* BL21(DE3). Le plasmide DE3 porte le gène codant pour l'ARN polymérase T7 qui est sous le contrôle du promoteur P*lac* et de l'opérateur *lacO*.

La purification de la protéine Bax a tout d'abord été réalisée par chromatographie d'affinité sur une colonne de nickel (Ni-NTA, Qiagen) en l'absence de détergents, ces derniers étant la cause de l'agrégation aspécifique de Bax (Hsu et Youle, 1997 et 1998 ; Antonsson *et al.,* 2000), et en condition dénaturante. La transformation bactérienne de la souche bactérienne *E. coli* BL21(DE3)pLysS permet l'expression de la protéine Bax dans un système procaryotique sous un promoteur inductible par l'IPTG. L'interaction entre les ions chélateurs nickel de la colonne Ni-NTA et le tag 6 x Histidine de la protéine recombinante permet l'isolement de la protéine d'intérêt parmi l'ensemble des protéines bactériennes de la souche d'*E. coli* choisie pour l'expression. Le mode expérimental est décrit dans le paragraphe suivant.

Une pré-culture a été lancée à partir d'un stock glycérol dans 5 ml de milieu LB contenant de l'ampicilline (100 µg/ml), et du chloramphénicol (34 µg/ml) une nuit à 37 °C à 225 rpm. 1 litre de milieu LB (ampicilline 100 µg/ml, chloramphénicol 34 µg/ml) est ensemencé avec cette pré-culture (préalablement centrifugée et reprise dans 1 ml de milieu frais). Cette culture est ensuite incubée à 37 °C à 300 rpm jusqu'à l'obtention d'une densité optique comprise entre 0.7 et 1. Puis, nous ajoutons à la culture de l'IPTG (isopropyl β–D-thiogalactopyranoside) à une concentration finale de 0,5 mM. La culture induite est encore incubée pendant 4 heures à 37 °C, sous agitation à 300 rpm. La culture est arrêtée est centrifugée à 9 800 g à 4 °C pendant 15 min. Les culots sont ensuite conservés à – 80 °C.
Les culots sont repris avec 30 ml de tampon de lyse A (NaH_2PO_4 100 mM, Tris-base 10 mM, Guanidine HCl 6 M, pH 7). Les bactéries sont lysées par sonication (6 cycles de 15 s, appareil Virsonic 100, VIRTIS). Le lysat bactérien est centrifugé à 10 000 g à 4 °C pendant 10 min. Le surnagent est mis en contact avec la colonne de nickel (pré-équilibrée avec le tampon A pendant 1 h à 4 °C) pendant 2 heures à 4°C à l'agitateur rotatif. Puis la résine est coulée sur colonne après une dernière centrifugation à 2 000 g à 4 °C pendant 10 min. La pompe est mise à 10 ml/heure et un premier lavage est réalisé avec 5 volumes (par rapport à la colonne) de tampon A. La pompe est réglée à 5 ml/heure et un second lavage est réalisé sur la nuit avec du tampon B (NaH_2PO_4 100 mM, Tris-base 10 mM, Urée 8 M, pH 7). La pompe est remise à 10 ml/heure et la colonne est lavée avec le tampon C (NaH_2PO_4 100 mM, Tris-base 10 mM, urée 8 M, imidazole 10 mM, pH 7) pendant ½ heure. Ce dernier lavage permet d'éluer les dernières protéines bactériennes fixées de manière aspécifique sur la colonne. La pompe est mise sur 15 ml/heure et l'élution est réalisée par un gradient de concentration d'imidazole par ajout de tampon D (NaH_2PO_4 100 mM, Tris-base 10 mM, urée 8 M, imidazole 250 mM, pH 7). En moyenne, 40 fractions ont été récoltées. Le profil d'élution est établi en mesurant l'absorbance des protéines à 280 nm. Le profil obtenu est illustré figure 42. Nous avons mélangé les fractions 17 à 19 (pool n°1), les fractions 20 à 24 (pool n°2) et les fractions 25 à 27 (pool n°3) et avons dialysé les 3 pools 3 fois contre du PBS (1ère dialyse 16 h, 2ème dialyse 8 h, 3ème dialyse 16 h).

Nous avons rencontrés des difficultés à chaque tentative de purification de la protéine recombinante Bax. En effet, systématiquement, les protéines précipitent au cours de la dialyse. Ceci est probablement dû à la solubilité de la protéine Bax. Nous avons été obligé de filtrer les différents pools d'élution afin d'éliminer les précipités (filtration à 0,2 µm). La quantification protéique a ensuite été réalisée avec une solution commerciale de Bradford.

Comme nous pouvons l'observer sur le tableau 22, les rendements de la purification sont très faibles. Nous avons probablement perdu beaucoup de protéines lors de l'étape de la filtration qui a suivi la dialyse.

	Volume	Concentration
Pool n°1	2,5 ml	0,07 µg/ml
Pool n°2	7,5 ml	0,18 µg/ml
Pool n°3	2,5 ml	0,08 µg/ml

Tableau 22 : Dosage protéique des différents pools de protéines élués de la colonne de chromatographie.

Nous avons ensuite réalisé une coloration argentique et un western-blot pour vérifier la présence de notre protéine recombinante dans les différentes fractions récoltées. Les résultats sont illustrés figure43. La coloration argentique nous montre que la purification n'a pas été efficace, car il reste de nombreux contaminants. Il faudra améliorer les conditions de purification, notamment au niveau de la production de protéines, et introduire une étape supplémentaire au protocole de purification : une colonne de gel-filtration pour éliminer au moins toutes les protéines de poids moléculaire supérieur à 25 kDa. Le western-blot montre que la protéine Bax n'est présente que dans le pool n°1. Cependant, l'absence de protéine Bax dans les autres pools peut aussi être expliquée par la limite de détection de l'anticorps primaire. Nous ne pourrons pas trancher sur ce sujet, vu que la quantité de protéines déposées sur les gels de SDS-PAGE est très faible.

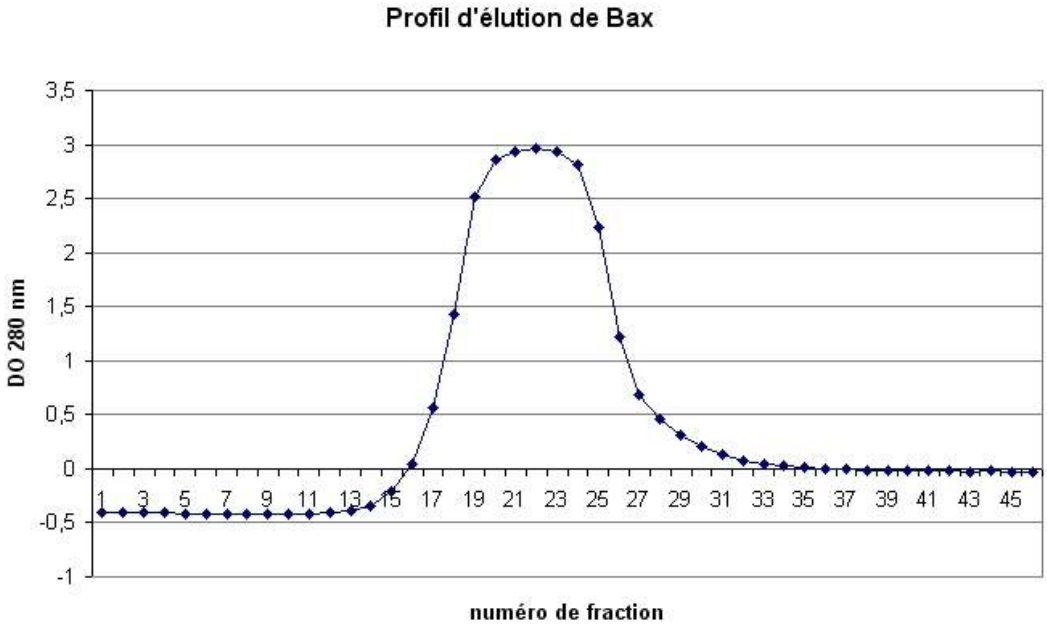


Figure 42 : Profil d'élution de la protéine Bax histidine-taggée. L'absorbance des différentes fractions récoltées lors de l'élution a été lue à 280 nm afin d'établir ce profil.

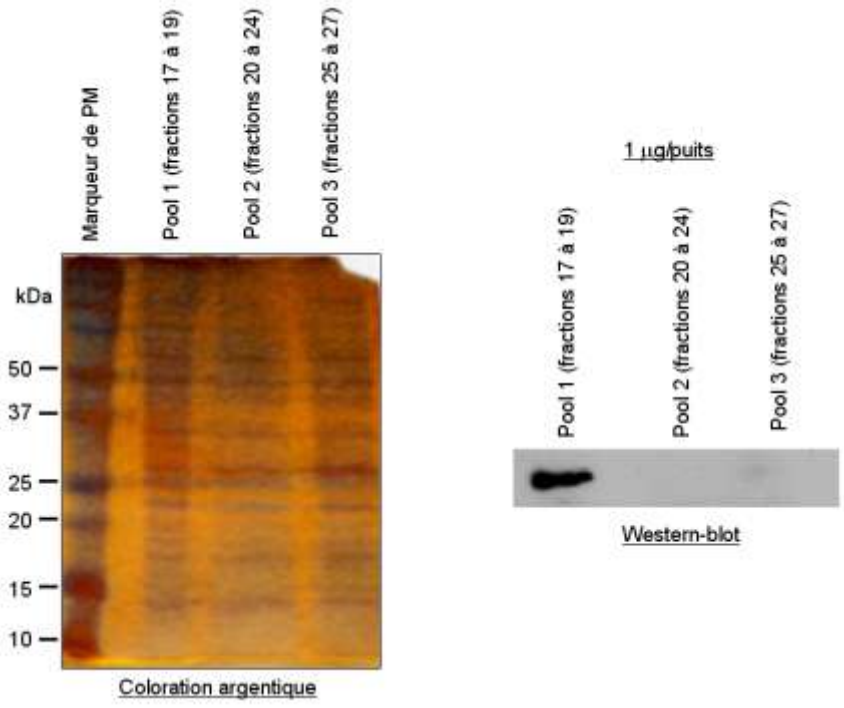


Figure 43 : Coloration argentique et Western-blot sur les fractions éluées de la colonne de nickel. Après la purification, nous avons effectué une coloration argentique classique et un gel SDS-PAGE 12 % en déposant 1 µg de chacun des 3 pools de protéines dans chaque puits. Après transfert sur une membrane de PVDF, la membrane a été incubée avec un anticorps primaire dirigé contre la protéine Bax (DakoCytomation) puis avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase. Le signal a été révélé par une réaction de chimioluminescence et exposition sur un film radiographique.

Suite aux premières tentatives de purification de la protéine Bax, il est devenu évident d'améliorer les conditions de production de la protéine. Pour cela, il s'est avéré utile de tester différentes souches bactériennes.

La présence de codons rares (notamment codant pour l'arginine, la proline, et l'isoleucine) dans la séquence du gène *bax* pouvant interrompre la traduction, des souches d'*E. coli* BL21(DE3), capable de transcrire ces codons rares, peuvent être alors utilisées.

Il est utile en biotechnologie de se rappeler que différents organismes n'utilisent pas avec le même enthousiasme tous les codons disponibles pour un même acide aminé. Certains codons sont clairement favorisés par rapport à d'autres, ce qui se reflète souvent dans l'abondance des ARNt correspondants. Ce phénomène est probablement lié à des considérations économiques pour les organismes.

En exprimant une séquence d'ADN dans un système hétérologue (*H. sapiens* dans *E. coli*, par exemple), mieux vaut donc être sûr d'utiliser une séquence qui sera facilement traduite par les ARNt de l'hôte, quitte à changer par génie génétique des codons défavorisés par des codons favorisés. Sinon, on risque de s'exposer à des tracas du genre :

- traduction retardée entraînant une baisse de la stabilité de l'ARNm ;

- terminaison prématurée, pouvant mener à des protéines trop courtes ou instables ;

- changements de cadre de lecture ou mauvaise incorporation ;

- inhibition de la synthèse protéique.

Dans le tableau suivant (tableau 23), on compare trois organismes et leur préférence en fait de codons codant pour l'arginine. Si tout était égal par ailleurs, on s'attendrait à ce que chacun des six codons Arg soit représenté avec une fréquence d'environ 16,5 % et en effet, chez l'homme, il n'existe qu'un léger biais qui défavorise le codon CGT. Par contre, chez *S. cerevisiae*, les codons CGG, CGC et CGA ne représentent respectivement que 2 %, 4 % et 5 % des codons Arg du génome et la levure ne fabrique que très peu des ARNt portant les anticodons appropriés. Une séquence humaine exprimée dans la levure aurait intérêt à voir tous ses codons Arg changés pour AGA, qui est fortement favorisé par cet organisme.

codon	*H. sapiens*	*S. cerevisiae*	*E. coli*
AGG	21,5	17,0	3,2
AGA	21,0	54,0	4,3
CGG	18,2	2,0	9,0
CGA	10,7	5,0	5,0
CGT	9,1	17,0	36,0
CGC	19,5	4,0	40,0

Tableau 23 : Comparaison de l'utilisation préférentielle de codons par trois organismes différents.

Les six codons les moins utilisés chez *E. coli*, et leur fréquence chez l'homme (nombre par millier de codons) sont indiqués dans le tableau suivant (tableau 24):

Codon	AGG	AGA	CGA	CUA	AUA	CCC
Acide aminé	R	R	R	L	I	P
E. coli	1,4	2,1	3,1	3,2	4,1	4,3
H. sapiens	11	11,3	6,1	6,5	6,9	20,3

Tableau 24 : Codons les moins utilisés chez *E. coli* et chez l'homme. Les fréquences d'utilisations sont également indiquées. (Strategies Newsletter (2000) vol. 3 (1) p.31).

Les huit codons les moins utilisés *chez E. coli* et les primates sont les suivants (tableau 25):

E. coli	AGG	AGA	AUA	CUA	CGA	CGG	CCC	UCG					
Primate					CGA	CGG		UCG	CGC	CCG	GCG	ACG	CGU
Acide aminé	R	R	I	L	R	R	P	S	R	P	A	T	R

Tableau 25 : Les huit codons les moins utilisés chez *E. coli* et chez les primates.

Certaines souches bactériennes commerciales contiennent des transgènes exprimant les ARNt normalement sous-exprimés. De telles souches nous permettent de contourner le problème sans avoir à optimiser les codons des protéines que l'on veut faire exprimer. Nous disposons

de deux souches de ce type : BL21-CodonPlus(DE3)-RP (Stratagene) et BL21(DE3) Rosetta pLysS (Novagen). Leur génome est indiqué tableau 26.

Souches d'*E. coli*	génome
BL21-CodonPlus(DE3)-RP	F– *ompT hsdS*($r_B^- m_B^-$) *dcm*+ Tet^R *gal* λ (DE3) *endA* Hte *[argU proL* Cm^R]
BL21(DE3) Rosetta pLysS	F– *ompT* $hsdS_B(r_B^- m_B^-)$ *gal dcm lacY1* (DE3) pRARE (argU, argW, ilex, glyT, leuW, proL) (Cm^R)
BL21(DE3)c41	F′ *ompT* $hsdS_B$ ($r_{B-} m_{B-}$) *gal dcm* DE3

Tableau 26 : Génome des différentes souches d'*E. coli* utilisés dans mon étude.

Ces deux souches de bactéries possèdent des gènes supplémentaires codants pour des ARNt de codons rares. Ces codons rares sont indiqués dans le tableau 27. Ces modifications permettent la surexpression de protéines qui en temps normal sont difficiles, voir impossible à exprimer dans les souches d'*E. coli* conventionnelles à cause de la présence de codons rares.

Souches d'*E. coli*	Codons rares
BL21-CodonPlus(DE3)-RP	R (AGG, AGA) et P (CCC)
BL21(DE3) Rosetta pLysS	R (AGG/AGA), R (CGG), I (AUA), L (CUA), P (CCC) et G (GGA)

Tableau 27 : ARNt de codons rares surexprimés. Seuls les codons rares (entre parenthèses) et les acides aminés correspondants (code à une lettre) sont indiqués.

Nous disposons également de la souche d'*E. coli* BL21(DE3)c41 (Avidis, France). Son génome est donné dans le tableau 26. Cette souche est recommandée pour l'expression de protéine membranaire. En effet, cette bactérie possède des invaginations de sa membrane, permettant l'insertion de protéine membranaire en grande quantité, ce qui peut être intéressant pour surexprimer Bax puisque c'est une protéine capable de s'insérer dans des membranes.

Par ailleurs, nous disposons également de la souche d'*E. coli* BL21(DE3)pLysE (Invitrogen). Nous avons discuté de cette souche précédemment dans ce chapitre.
Enfin, nous disposons également des souches BL21-CodonPlus(DE3)-RP-pLysS-Bcl-2 (la souche BL21-CodonPlus(DE3)-RP avec le plasmide pLysS et un plasmide codant pour la protéine Bcl-2 en plus) et BL21-CodonPlus(DE3)-RP-Bcl-2 (la souche BL21-CodonPlus(DE3)-RP avec un plasmide codant pour Bcl-2 en plus). Le plasmide codant pour Bcl-2 (plasmide portant le gène de résistance à la kanamycine) a été introduit dans ces souches : nous espérons ainsi neutraliser la protéine Bax dans le cas où cette protéine serait toxique pour la bactérie d'expression.

L'ensemble de ces différentes souches bactériennes, mise à part les BL21(DE3)pLysS, nous ont été offerts par le Docteur Svetlana Nedelkina (laboratoire de Résonance Magnétique Nucléaire de la Matière Condensée, à l'ISIS à Strasbourg).

Nous testerons l'expression de la protéine Bax dans ces différentes souches. Les bactéries sont rendues compétentes par la méthode au TSS (voir partie Matériels et Méthodes) et nous les transformons avec le plasmide pDEST 17 Bax. Les clones sont sélectionnés avec les antibiotiques indiqués dans le tableau 28.

Souches d'*E. coli*	Antibiotique(s) de sélection
BL21(DE3)pLysS	Amp + Cm
BL21(DE3)pLysE	Amp + Cm
BL21(DE3) Rosetta pLysS	Amp + Cm
BL21(DE3)c41	Amp
BL21-CodonPlus(DE3)-RP	Amp + Cm + Kan
BL21-CodonPlus(DE3)-RP-pLysS-Bcl-2	Amp + Cm + Kan
BL21-CodonPlus(DE3)-RP-Bcl-2	Amp + Cm + Kan

Tableau 28 : Antibiotiques de sélection utilisés pour l'isolation de clones transformés avec notre plasmide d'intérêt et pour les cultures. Amp : ampicilline 100 µg/ml ; Cm : chloramphénicol 34 µg/ml ; Kan : kanamycine 50 µg/ml.

Nous lançons des pré-cultures à partir d'un clone positif dans 2 ml de milieu LB contenant les antibiotiques appropriés (voir tableau 28), sur la nuit à 37 °C sous agitation à 225 rpm. 50 ml

de milieu LB contenant les antibiotiques appropriés sont ensemencés avec l'inoculum préalablement centrifugé et resuspendu dans 1 ml de milieu frais. Les cultures sont lancées au temps t = 0h sous agitation à 300 rpm à 37 °C et sont régulièrement suivies par mesure de la turbidité à 600 nm. Lorsque la DO atteint 0,7 à 1, les cultures sont divisées en deux et l'une des deux cultures est induite avec de l'IPTG (0,5 mM final). Nous continuons à suivre la $DO_{600\ nm}$ jusqu'à 4 h après induction. Un aliquot est prélevé régulièrement afin de suivre la production de la protéine recombinante Bax par western-blot (figure 44).

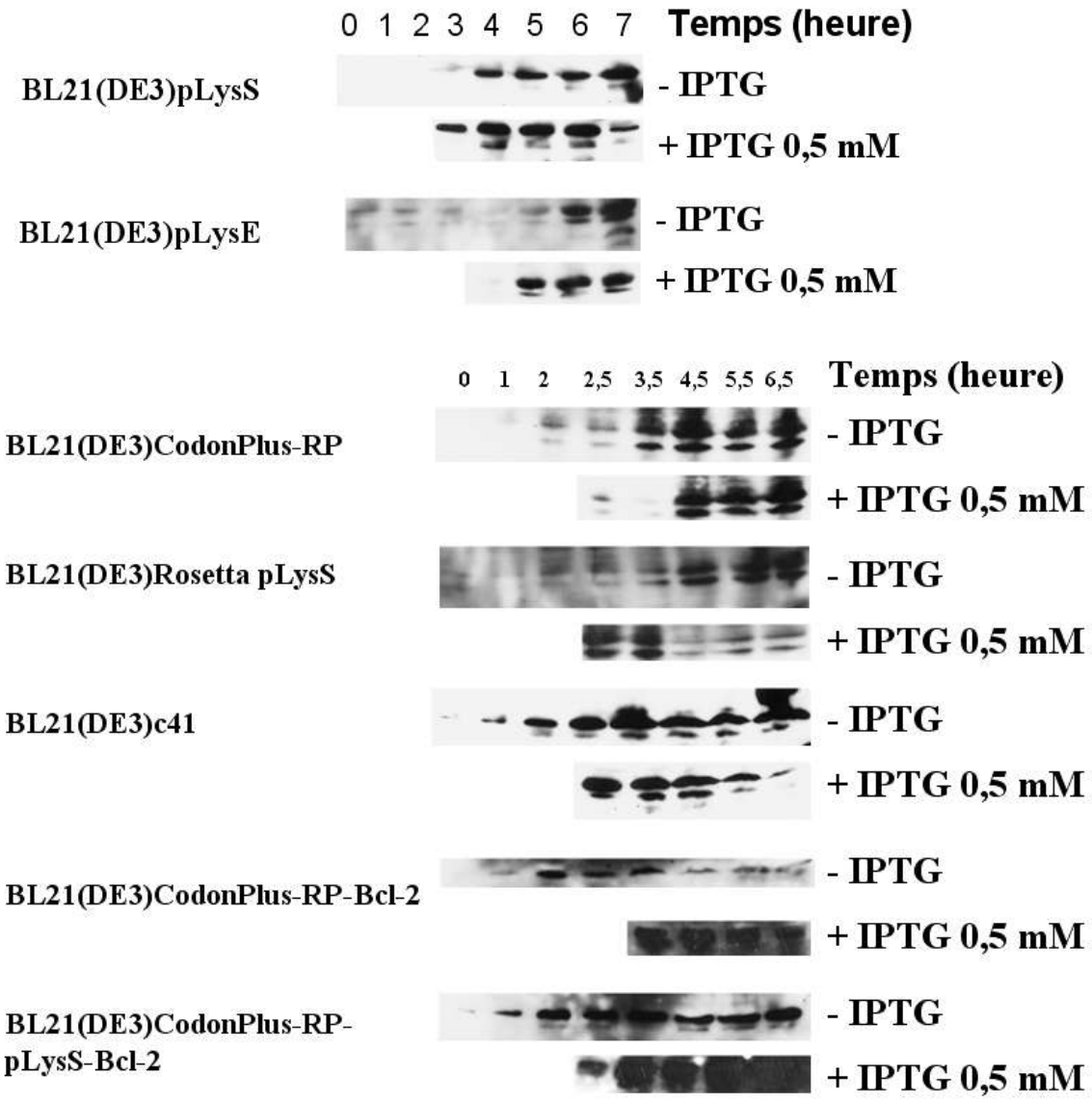
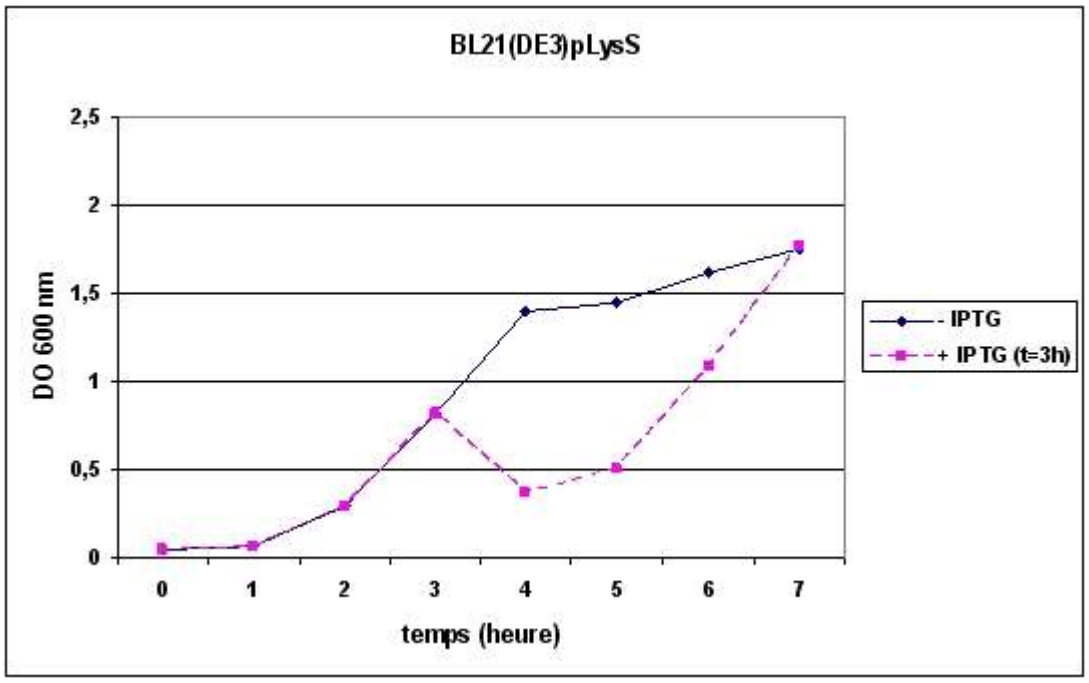


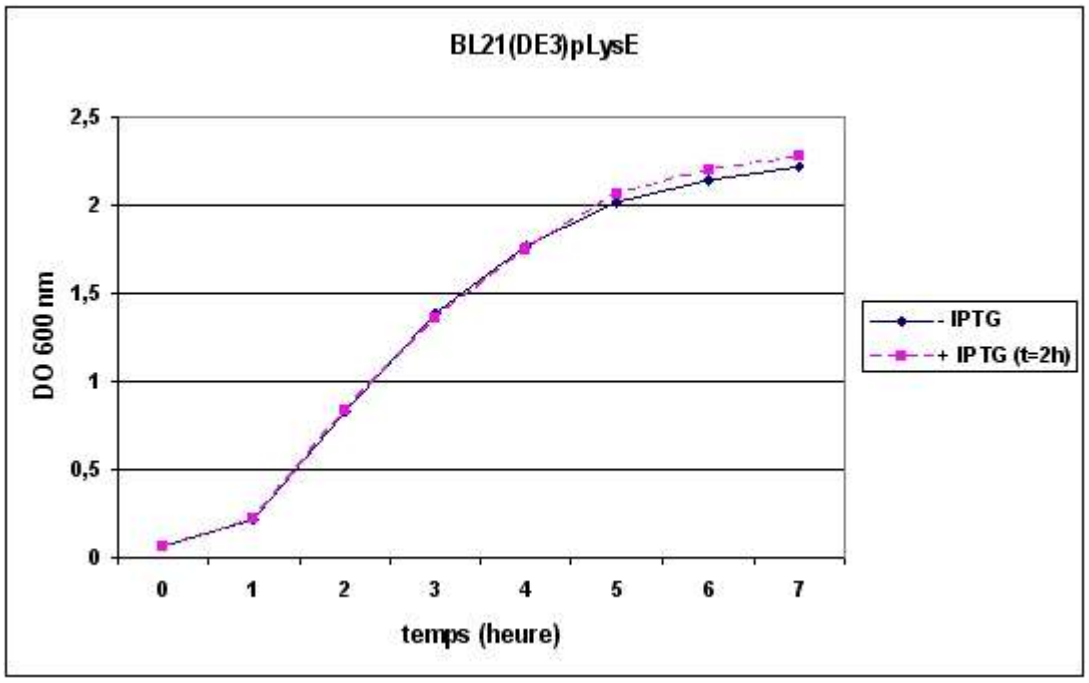
Figure 44 : Western-blots réalisés pour suivre la cinétique de production de la protéine recombinante Bax dans les différentes souches de bactéries d'expression. Un aliquot de chaque culture a été prélevé à différents temps et a été additionné de tampon de charge avant dépôt sur un gel SDS-PAGE 12 %. Un western-blot a ensuite réalisé avec un anticorps dirigé contre la protéine Bax (DakoCytomation) et la révélation a été faite par une réaction de chimioluminescence.

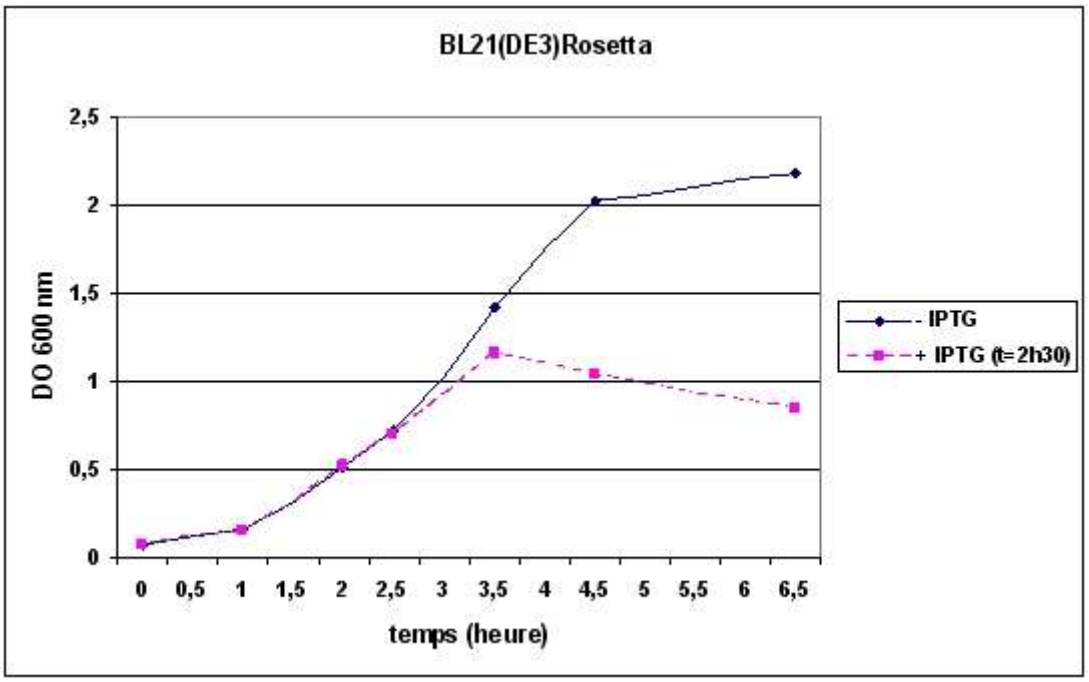
Nous pouvons observer chez les bactéries BL21(DE3)pLysS qu'il y a une fuite de promoteur, puisque nous observons la production de la protéine recombinante en absence d'induction par l'IPTG (figure 44). Il en est de même avec les bactéries BL21(DE3)pLysE, cependant la production de la protéine est mieux régulée car la fuite de promoteur a lieu plus tardivement (figure 44). L'induction par l'IPTG est effective dans ces deux souches de bactéries. Cependant, on observe une réduction de la production de Bax dans les BL21(DE3)pLysS au temps t = 7 h, probablement dû à la lyse observée dans ces cultures (voir figure 45).

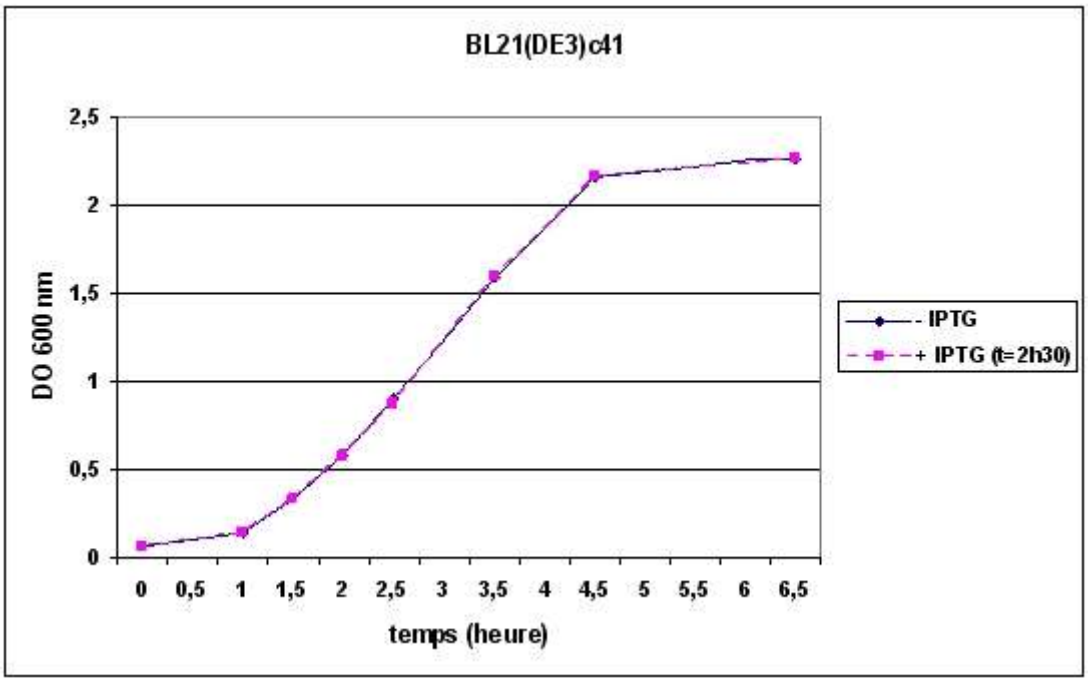
Dans les autres souches bactériennes, nous observons également des fuites de promoteur (figure 44), surtout pour les BL21(DE3)c41, les BL21-CodonPlus(DE3)-RP-pLysS-Bcl-2 et les BL21-CodonPlus(DE3)-RP-Bcl-2. L'expression de Bax semble être mieux contrôlée dans les BL21(DE3) Rosetta pLysS et les BL21-CodonPlus(DE3)-RP (figure 44), car la production de Bax est faible pendant les premières heures de culture. L'induction par l'IPTG est effective dans ces deux dernières souches. Cependant, nous pouvons observer la perte de production de Bax dans les BL21(DE3) Rosetta pLysS après induction par IPTG à partir du temps t = 4,5 h. Ceci est dû à la lyse bactérienne observée dans ces cultures lorsque nous induisons par l'IPTG (voir figure 45).

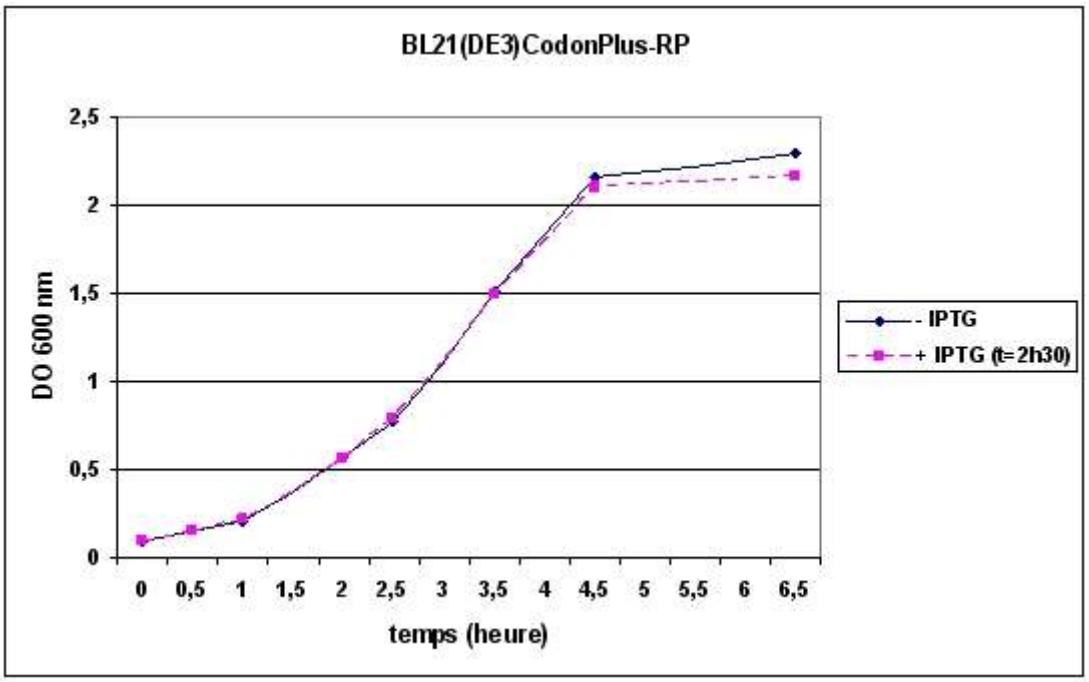
En définitive, les bactéries BL21(DE3)pLysE et BL21-CodonPlus(DE3)-RP semblent les plus adaptées à la production de la protéine recombinantes Bax car la production de Bax est régulée et inductible par l'IPTG. En outre, ces bactéries supportent l'induction par l'IPTG et ne lysent pas (figures 44 et 45).

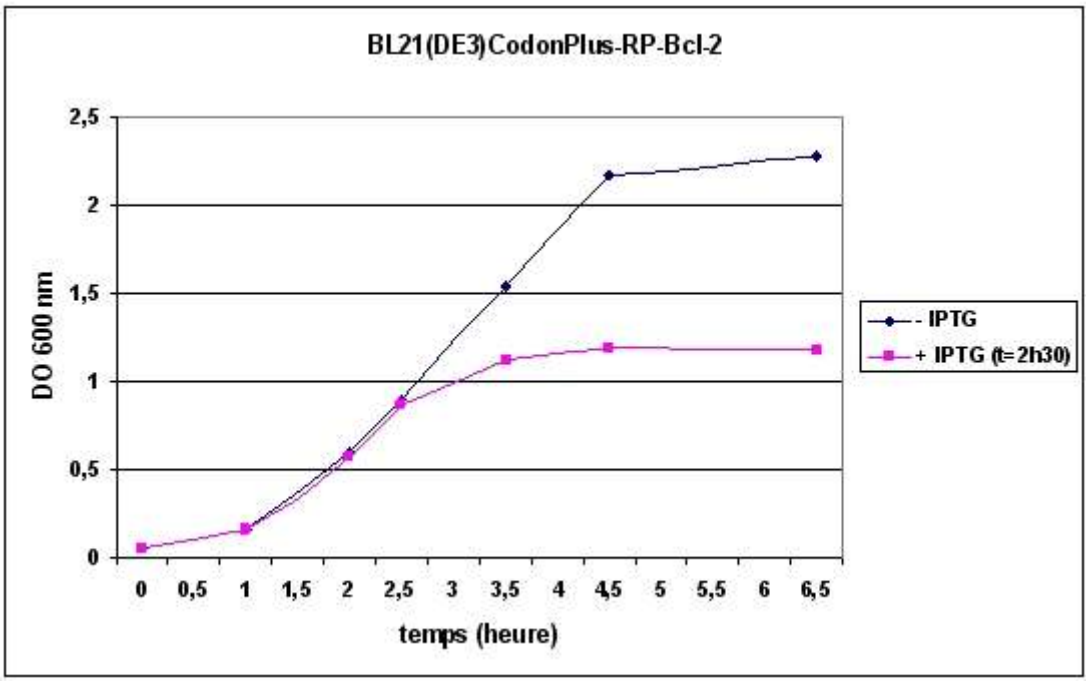

BL21(DE3)pLysS
DO 600 nm
2,5
2
1,5
1
0,5
0
0
1
2
3
4
5
6
7
temps (heure)
- IPTG
+ IPTG (t=3h)


BL21(DE3)pLysE
DO 600 nm
2,5
2
1,5
1
0,5
0
0
1
2
3
4
5
6
7
temps (heure)
- IPTG
+ IPTG (t=2h)


BL21(DE3)Rosetta
DO 600 nm
2,5
2
1,5
1
0,5
0
0 0,5 1 1,5 2 2,5 3 3,5 4 4,5 5 5,5 6 6,5
temps (heure)
- IPTG
+ IPTG (t=2h30)


BL21(DE3)c41
DO 600 nm
2,5
2
1,5
1
0,5
0
0 0,5 1 1,5 2 2,5 3 3,5 4 4,5 5 5,5 6 6,5
temps (heure)
- IPTG
+ IPTG (t=2h30)


BL21(DE3)CodonPlus-RP
DO 600 nm
2,5
2
1,5
1
0,5
0
0 0,5 1 1,5 2 2,5 3 3,5 4 4,5 5 5,5 6 6,5
temps (heure)
- IPTG
+ IPTG (t=2h30)


BL21(DE3)CodonPlus-RP-Bcl-2
DO 600 nm
2,5
2
1,5
1
0,5
0
0 0,5 1 1,5 2 2,5 3 3,5 4 4,5 5 5,5 6 6,5
temps (heure)
- IPTG
+ IPTG (t=2h30)

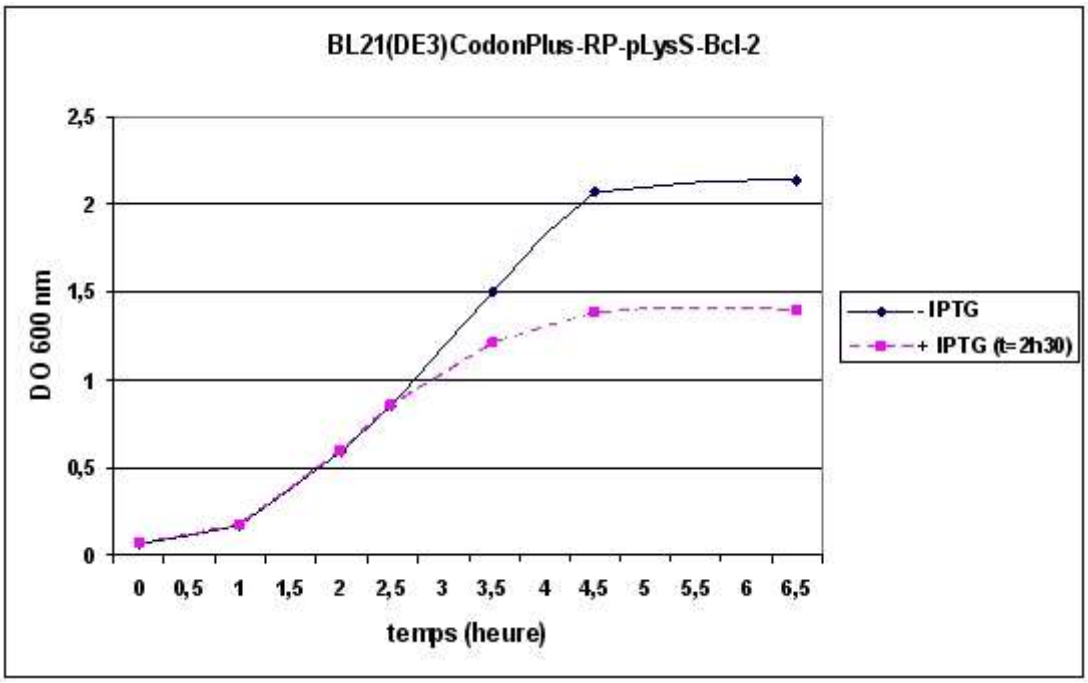


Figure 45 : Cinétique de croissance des bactéries d'expression transformées avec notre plasmide pDEST 17 Bax, avec ou sans induction par l'IPTG (5 mM final).

La croissance des bactéries d'expression a été suivie avant et après induction. Ces cinétiques sont illustrées figure 45. Nous pouvons observer que les bactéries BL21(DE3)pLysE, BL21(DE3)c41 et BL21-CodonPlus(DE3)-RP supportent l'induction par l'IPTG dans nos conditions de culture : il n'y pas de lyse cellulaire. En revanche, les bactéries BL21(DE3)pLysS, BL21(DE3) Rosetta, BL21-CodonPlus(DE3)-RP-pLysS-Bcl-2 et BL21-CodonPlus(DE3)-RP-Bcl-2 semblent être sensibles à l'induction par l'IPTG. Les BL21-CodonPlus(DE3)-RP-pLysS-Bcl-2 et BL21-CodonPlus(DE3)-RP-Bcl-2 s'arrêtent de croître, alors que les BL21(DE3)pLysS lysent dans un premier temps puis reprennent leur croissance. Ceci est probablement dû à l'épuisement des antibiotiques dans le milieu de culture et à la perte des plasmides par les bactéries. Quant aux BL21(DE3) Rosetta, elles lysent et ne reprennent pas leur croissance. En conclusion, les bactéries BL21(DE3)pLysE, BL21(DE3)c41 et BL21-CodonPlus(DE3)-RP semblent être plus adaptées pour la production de notre protéine d'intérêt car elles ne lysent pas après induction par l'IPTG.

Nous sélectionnons les bactéries BL21(DE3)CodonPlus-RP pour les différentes raisons invoquées précédemment pour poursuivre notre étude et produire la protéine recombinante Bax.

Nous avons par la suite essayé la purification de Bax en condition non dénaturante. Les cultures ont été réalisées comme précédemment décrit avec les bactéries BL21(DE3)CodonPlus-RP et le plasmide pDEST17 Bax.

La culture a été centrifugée et nous avons obtenu 7 g de culot bactérien. Les bactéries ont été lysées dans 70 ml d'une solution commerciale Cell Lytic B+ (Sigma) contenant du lysozyme, des inhibiteurs de protéases et du benzonase (inhibiteur de protéase de protéine à phosphate), pendant 15 min à température ambiante. Le lysat a ensuite été centrifugé 15 min à 2000 g à 4° C. Le surnageant résultant a été mis en contact avec une résine commerciale HIS-Select Nickel Affinity Gel (Sigma) et incubé ainsi 10 min à température ambiante. Puis la résine est centrifugée à 4 500 g à 4 °C pendant 5 min afin d'éliminer le surnageant. La résine est ensuite lavée 4 fois avec 100 ml de solution A ($NaHPO_4$ 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8) et une fois avec la solution B ($NaHPO_4$ 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazole 20 mM, pH 8). L'élution est réalisée avec 80 ml de solution C ($NaHPO_4$ 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazole 250 mM, pH 8). Le profil d'élution est réalisé par mesure de l'absorbance à 280 nm et les fractions positives sont rassemblées en 3 pools qui sont dialysés contre du PBS (3 x 2 litres). Après dialyse, les éluats ont été filtrés avec un filtre 0,2 µm. Les concentrations protéiques ont été déterminées par une solution commerciale de Bradford et sont indiqués tableau x. Nous avons également fait un western-blot afin de vérifier la présence de notre protéine dans les différentes fractions recueillies à chaque étape de la purification (figure 46).

Les rendements de la purification (tableau 29) restent faibles pour transposer ce protocole pour une purification de protéine marquée pour une étude RMN. Cependant, la protéine Bax purifiée a été utilisée pour des expériences de micro-injection et de Biacore où elle semble conserver ses propriétés de perméabilisation mitochondriale suite à l'activation par tBid et d'interaction avec des peptides de protéine à BH3 seulement respectivement (données non montrées).

	Concentration
Pool n°1	0,236 µg/ml
Pool n°2	0,039 µg/ml
Pool n°3	0,016 µg/ml

Tableau 29 : Dosage protéique des différents pools de protéines élués de la résine de nickel.



Figure 46 : Western-Blots des différentes fractions recueillies au cours de la purification de Bax. Au cours de la purification, un aliquot est prélevé à chaque étape et déposé sur un gel SDS-PAGE 15 %. Un western-blot est réalisé et la membrane a été incubée avec un anti-corps dirigé contre Bax (DakoCytomation). S : 1er surnageant de la colonne ; L1 à L5 : lavage 1 à 5 de la colonne ; E1 à E3 : pool n°1, 2 et 3 élués de la colonne. Nous pouvons observer que nous avons perdu de la protéine purifié dans le surnageant S et dans le premier lavage L1. Ceci est probablement dû à la saturation de la colonne de nickel. En revanche, nous n'avons pas perdu de protéines au cours des lavages 2 à 5. L'élution est efficace puisque l'on retrouve du Bax dans nos aliquots (pistes E1 et E2). Le 3ème pool de protéine (E3) présente très peu de Bax, le signal obtenu par western-blot est très faible et n'est pas visible sur la photo mais est détectable sur le film radiographique.

Inhérent à la technique de clonage utilisée, la protéine recombinante Bax possède, en N-terminal, 21 acides aminés surnuméraires par rapport à la protéine native (voir figure 47). Ceux-ci sont majoritairement dus à la séquence de recombinaison attB1 et au tag histidine. Ces 21 acides aminés surnuméraires en N-terminal de la protéine Bax pourraient modifier la structure de Bax. C'est pourquoi, il me semblait utile d'insérer un site de clivage de la protéase TEV (Tobacco Etch Virus) entre l'ORF et la séquence de recombinaison attB1. L'ajout de ce site est réalisé lors d'une étape de PCR (voir Matériel et Méthode), et permettrait, après digestion de la protéine recombinante, d'éliminer 20 des 21 acides aminés ajoutés (figure 47).

Malheureusement, je n'ai pas pu terminer le clonage de TEV Bax dans le plasmide pDEST17 pour des raisons techniques. Cependant, Svetlana Nedelkina, du laboratoire de Résonance Magnétique Nucléaire de la Matière Condensée à l'ISIS à Strasbourg, nous a gracieusement donné un plasmide où Bax est cloné après un site de digestion TEV (figure 48).

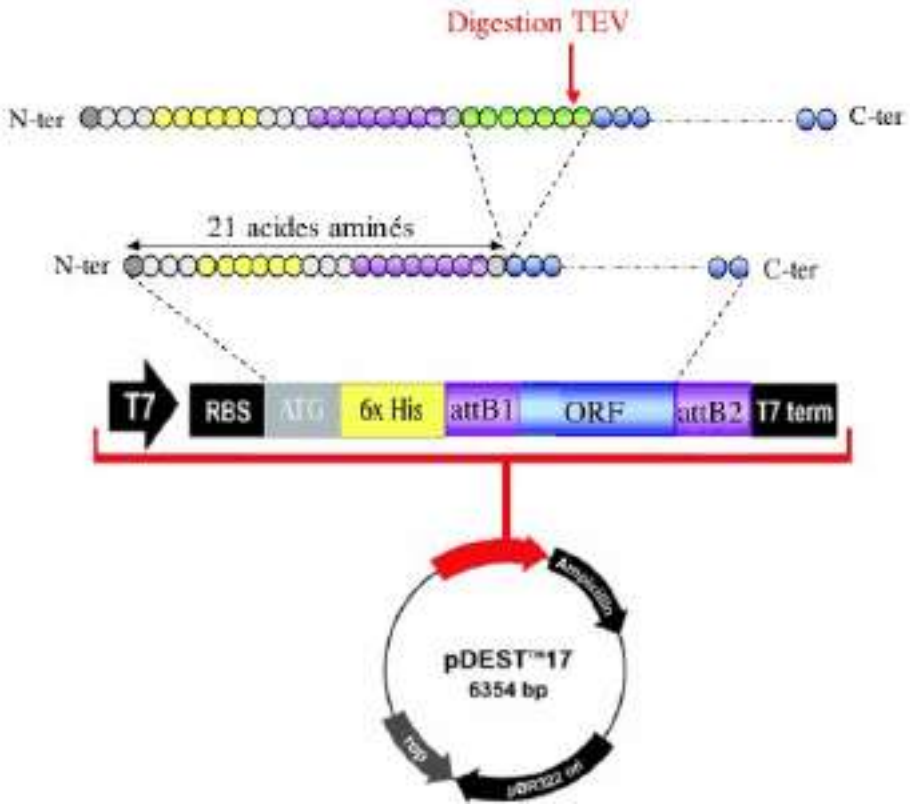


Figure 47 : Structure des protéines recombinantes. Avant l'introduction (lors de lère étape de PCR) du site sensible à la TEV, les protéines possédaient 21 acides aminés supplémentaires par rapport à la protéine native.

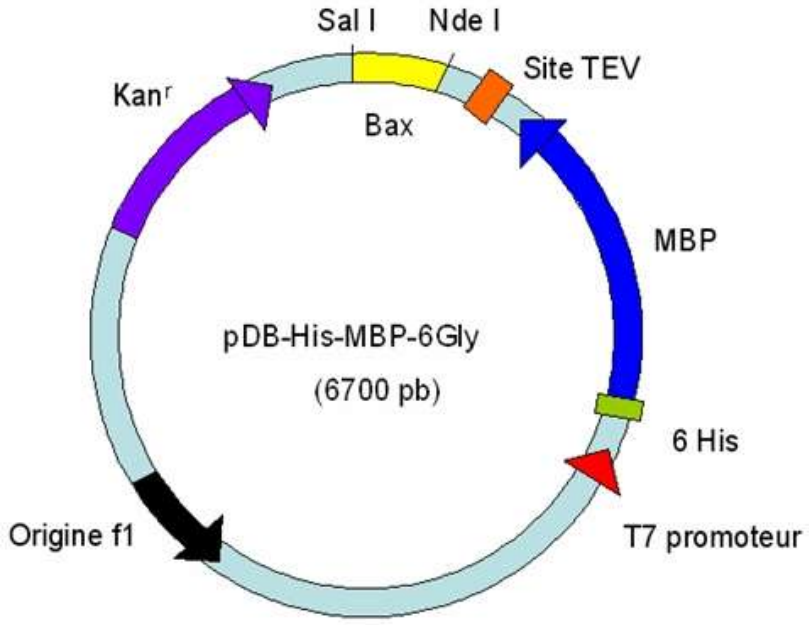


Figure 48 : Carte du plasmide TEV Bax. Bax est cloné entre les sites Nde I et Sal I dans un plasmide pDB en fusion avec un tag 6 histidine et un tag MBP (Maltose Binding Protein) en N-terminal. Un site de clivage de la protéase TEV est inséré entre les tags et l'ORF de Bax. Ce plasmide porte un gène de résistance contre la kanamycine (Kan^r) et l'ORF est placé sous le contrôle d'un promoteur pour l'ARN polymérase T7 (T7 promoteur). La protéine de fusion 6xHis-MBP-TEV-Bax fait 64 kDa.

Nous avons utilisé ce plasmide TEV Bax pour continuer à mettre au point un protocole de purification de Bax non tagué.

Nous avons utilisé les bactéries BL21(DE3)CodonPlus-RP que nous avons transformé avec le plasmide TEV Bax. Un clone a été choisi pour lancer une pré-culture puis une culture dans du milieu LB additionné de kanamycine (25 µg/ml) et de chloramphénicol (34 µg/ml), à 37 °C à 300 rpm. Lorsque la DO_{600nm} atteint 0,6 nous induisons l'expression de notre protéine par ajout d'IPTG au milieu de culture (0,5 mM final) et continuons la culture à 30 °C jusqu'à 5 h après induction. Les culots sont récupérés par centrifugation à 3 000 g 15 min à 4 °C. Nous avons essayé deux types de colonnes de nickel commerciales (Ni-TED et Ni-IDA de Macherey Nagel) pour effectuer la purification en suivant les instructions du fournisseur. Cependant, nous avons rencontré de nombreuses difficultés techniques et n'avons pu obtenir de rendements satisfaisants.

Cette étude de purification de la protéine recombinante Bax sera poursuivie au laboratoire avec deux buts :

- étude de la structure de Bax en bicouche lipidique. Par extension, nous souhaiterions également étudier la structure de mutants de Bax (comme BaxΔC notamment) ;
- production d'anti-corps conformation dépendante dirigée contre Bax. Nous souhaiterions notamment produire des anti-corps qui reconnaîtraient Bax activé par la prostaglandine PGE_2. En effet, nous avons démontré au laboratoire que la prostaglandine PGE_2 s'associe à Bax dans des cultures primaires issues de glioblastome humain et induit le changement conformationnel et l'adressage de Bax à la mitochondrie (Lalier *et al.,* soumis).

IV. AUTRES RESULTATS

Le Docteur Svetlana Nedelkina, du laboratoire de Résonance Magnétique Nucléaire de la Matière Condensée, à l'ISIS à Strasbourg, a purifié la protéine de fusion MBP-Bcl-2 afin d'étudier sa structure par RMN dans des bicouches lipidiques. Mais avant de passer à l'étude structurale, nous souhaitions faire quelques études fonctionnelles sur cette protéine recombinante, afin de valider sa structure.

Le mode de production de cette protéine, ainsi que le protocole de purification sont restés confidentiels. Cependant, je dispose de la carte du plasmide ayant servi à la surexpression de la protéine recombinantes Bcl-2 (figure 49). L'ADNc de Bcl-2 a été cloné entre les sites Nde I et Sal I du plasmide pDB, en fusion avec un tag 6 x Histidine pour une purification sur résine de nickel, un tag MBP (Maltose Binding Protein) qui devrait permettre de solubiliser la protéine Bcl-2 et un site de clivage protéolytique TEV. La fusion est en N-terminal de Bcl-2. Ce plasmide porte un gène de résistance contre la kanamycine (Kan^r) et l'ORF est placé sous le contrôle d'un promoteur pour l'ARN polymérase T7 (T7 promoteur). Le poids moléculaire de la protéine de fusion 6xHis-MBP-TEV-Bcl-2 (que nous appellerons MBP-Bcl-2) est estimé à environ 64 kDa.

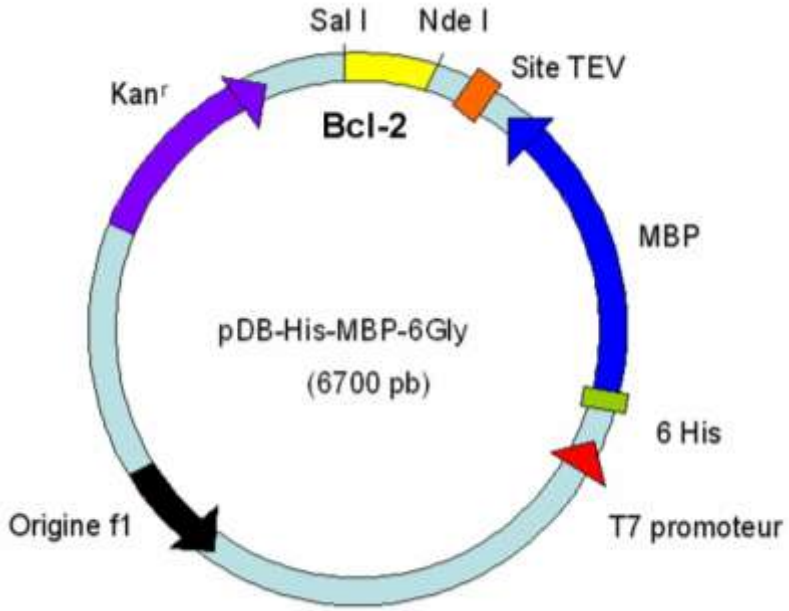


Figure 49 : Carte du plasmide MBP-Bcl-2.

Nous souhaitions savoir si la protéine recombinante MBP-Bcl-2 purifiée est fonctionnelle, à savoir si elle est capable de s'insérer dans les membranes mitochondriales et si elle est toxique ou non pour les mitochondries. Pour répondre à ces questions, nous avons envisagé de faire des tests en système acellulaire d'insertion dans les mitochondries et de relargage de cytochrome *c*.

Dans un premier temps, nous avons testé l'insertion de la protéine recombinante MBP-Bcl-2 dans les membranes mitochondriales. Pour cela, nous avons incubé des mitochondries de foie de rat BDIV avec des quantités croissantes de protéine MBP-Bcl-2 pendant 1 h à 4 °C. Une partie des mitochondries a ensuite était traitée avec une solution alcaline pendant 1 h à 4 °C. Une simple centrifugation de 20 min à 8 000 g a permis de récupérer le surnageant et le culot de chaque réaction. Ensuite, nous réalisons un western-blot classique avec les échantillons obtenus (figure 50).

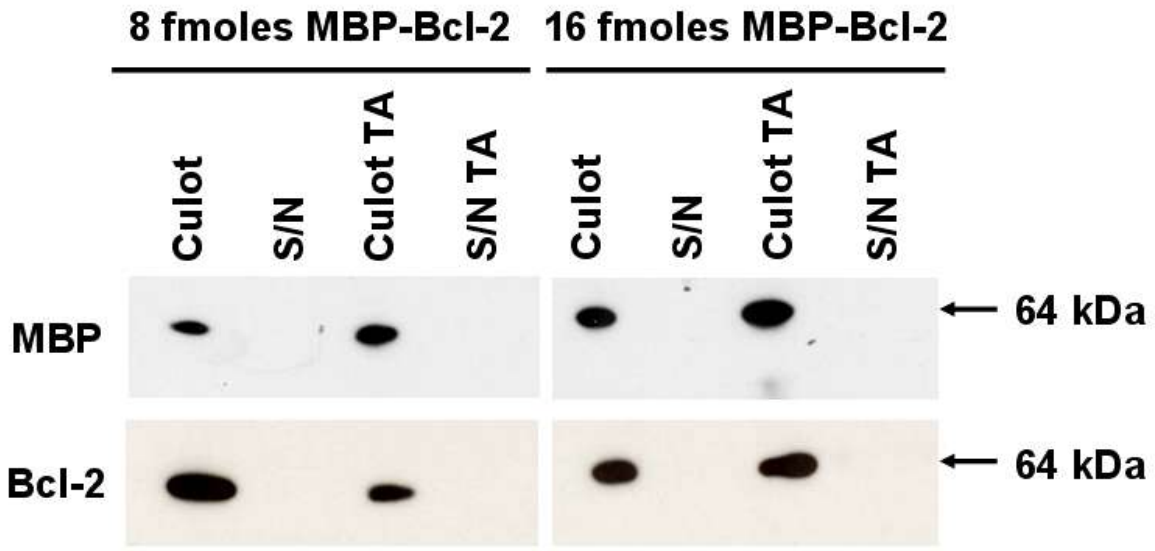


Figure 50 : Test acellulaire d'insertion de la protéine recombinante MBP-Bcl-2. Des mitochondries de foie de rat BDIV ont été incubées avec 8 ou 16 fmoles de protéine recombinantes MBP-Bcl-2 pendant 1 h à 4 °C. Une partie des mitochondries a été ensuite incubée avec une solution alcaline pendant 1 h à 4 °C. Les mitochondries ont ensuite été centrifugées 20 min à 8 000 g. Les culots et surnageants (S/N) traitées ou non avec la solution alcaline (TA, traitement alcalin) sont ensuite déposés sur un gel SDS-PAGE 12 % puis un western-blot classique a été réalisé. La membrane a été incubée avec un anti-corps dirigé contre Bcl-2 (DakoCytomation) ou contre MBP (Abcam), puis avec un anti-corps secondaire couplé à la peroxydase. La révélation a été réalisée par chimioluminescence.

Nous pouvons observer que l'intégralité de la protéine recombinante MBP-Bcl-2 est retrouvée dans la fraction mitochondriale (culot) puisque rien n'est détectable dans le surnageant (S/N) (figure 50). Lorsque nous traitons les mitochondries avec une solution alcaline (TA, traitement alcalin), l'intégralité de la protéine recombinante reste associée à la mitochondrie (culot TA) et rien n'est observé dans les surnageants (S/N TA) (figure 50). Nous observons des résultats similaires quelque soit la concentration de MBP-Bcl-2 mise en présence des mitochondries, et quelque soit l'anticorps utilisé (anticorps anti-Bcl-2 ou anti-MBP).
Ces résultats suggèrent que la protéine recombinante MBP-Bcl-2 s'insère dans la membrane mitochondriale externe, malgré la présence du tag MBP qui est censé rendre la protéine plus hydrophile, et que son association avec la mitochondrie est stable et résistant à un traitement alcalin.

Dans un deuxième temps, nous avons voulu savoir si notre protéine recombinante MBP-Bcl-2 était toxique ou non pour les mitochondries, c'est-à-dire si d'une manière ou d'une autre elle est capable de déstabiliser la membrane mitochondriale externe et par conséquent d'induire le relargage de cytochrome *c* de cet organelle. Pour cela, nous avons incubé des mitochondries de foie de rat BDIV avec des quantités croissantes de protéine MBP-Bcl-2 pendant 1 h à 4 °C. Ensuite, nous avons rajouté du cytosol de cellules HeLa : S100 contrôle pour le cytosol de cellules HeLa en condition contrôle, S100 UV pour le cytosol récupéré 12 h après induction de l'apoptose (1 min d'irradiation aux UV) de cellules HeLa. Ces fractions contiennent soit du Bax non activé (dans S100 contrôle), soit du Bax activé (S100 UV). Nous supposons que si la protéine MBP-Bcl-2 est fonctionnelle, elle devrait être capable de contrecarrer l'apoptose induite par Bax, et par conséquent d'inhiber le relargage de cytochrome *c* des mitochondries. En contrôle, nous avons incubé les mitochondries de foie de rat uniquement en présence de MBP-Bcl-2, sans rajouter de cytosol (- S100) (figure 51).

Nous pouvons observer que le rajout de S100 UV aux mitochondries induit le relargage partiel de cytochrome *c* des mitochondries (partie gauche de la figure 51), alors que le rajout de S100 contrôle n'induit pas le relargage de cytochrome *c*. Ceci indique la présence de Bax activé dans le S100 UV.
Le rajout de S100 UV dans les mitochondries incubées en présence de MBP-Bcl-2 (8 fmoles) ne permet pas d'inhiber le relargage de cytochrome *c* (partie centrale de la figure 51). Il en est de même en augmentant la quantité de MBP-Bcl-2 à 16 fmoles (partie droite de la figure 51). Bien au contraire, nous observons une augmentation de la quantité de cytochrome *c* libérée.

Ces résultats suggèrent que la protéine recombinante MBP-Bcl-2 n'est pas capable, dans nos conditions expérimentales, d'inhiber le relargage de cytochrome *c* induit par la protéine Bax activée. Cependant, il est utile de tester la fonctionnalité de la protéine MBP-Bcl-2 par d'autres tests fonctionnels *in vitro*, notamment par micro-injection, avant de conclure.

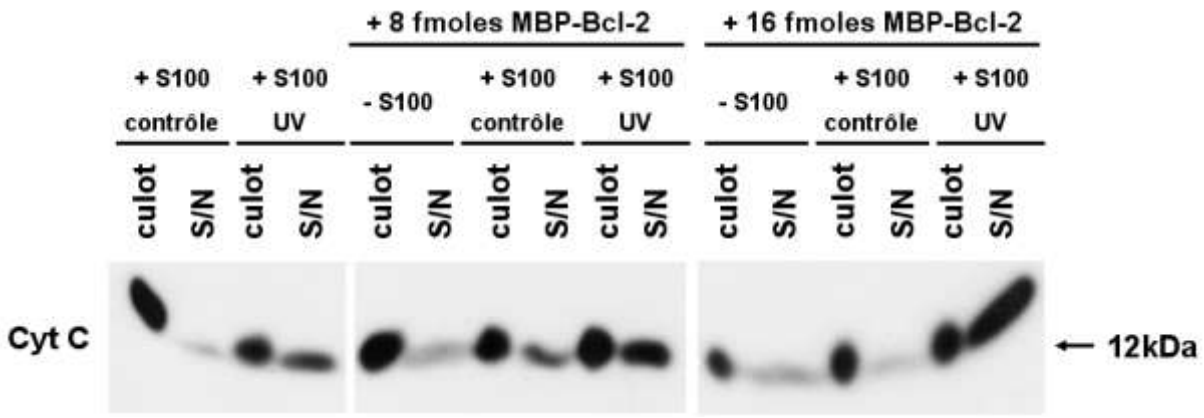


Figure 51 : Test acellulaire de relargage de cytochrome c par les mitochondries. Des mitochondries de foie de rat BDIV ont été incubées avec 8 ou 16 fmoles de protéine recombinantes MBP-Bcl-2 pendant 1 h à 4 °C, puis avec 200 µg de cytosol de cellules HeLa (S100) contrôle (S100 contrôle) ou apoptotique (irradiation UV 1 min + 12 h) (S100 UV) contenant du Bax activé, pendant 1 h à 4 °C. Les mitochondries ont ensuite été centrifugées 20 min à 8 000 g. Les culots et surnageants (S/N) sont ensuite déposés sur un gel SDS-PAGE 12 % puis un western-blot classique a été réalisé. La membrane a été incubée avec un anti-corps dirigé contre le cytochrome *c* (R&D Systems) puis avec un anti-corps secondaire couplé à la peroxydase. La révélation a été réalisée par chimioluminescence.

En définitive, la protéine recombinante MBP-Bcl-2 est capable de s'insérer dans la mitochondrie et son association avec cet organelle est stable. En outre, d'après notre test acellulaire, MBP-Bcl-2 ne semble pas pouvoir inhiber l'apoptose induite par Bax.

CONCLUSION ET DISCUSSION GENERALE.

Dans cette partie, nous discuterons des hypothèses qui portent sur l'activation de la protéine pro-apoptotique Bax, son adressage à la mitochondrie, son insertion à la membrane mitochondriale externe (MME), son oligomérisation et enfin la perméabilisation mitochondriale qu'elle induit.

I. ACTIVATION ET ADRESSAGE DE BAX A LA MITOCHONDRIE.

Bax réside sous forme monomérique et inactive dans le cytosol des cellules en absence de tout signal apoptotique. En réponse à des stimuli apoptotiques, Bax subit des changements conformationnels, notamment l'exposition de différents épitopes, qui permettent son adressage et son insertion à la mitochondrie (Cory et Adams, 2003). De façon intéressante, une étude rapporte que la protéine Bcl-2, bien que déjà insérée dans la MME *via* son extrémité C-terminale en temps normal, subit également un changement conformationnel après induction de l'apoptose (Kim PK *et al.,* 2004). A l'heure actuelle, aucun rôle n'est attribué à Bax dans le cytosol hors contexte apoptotique. En revanche, il a été montré que la protéine anti-apoptotique Bcl-2 intervient dans des mécanismes autres que l'apoptose, notamment la prolifération cellulaire, le contrôle du cycle cellulaire et une fonction anti-oxydante. Ainsi, il apparaît que le contrôle de la conformation cytosolique de Bax assure la survie des cellules en absence de signal apoptotique. Cela suggère que le signal responsable de l'adressage de Bax à la mitochondrie doit être exposé à un stade précoce de l'apoptose.

Des expériences de fractionnement cellulaire et de microscopie confocale montrent préférentiellement une localisation cytosolique dans la plupart des cellules, malgré la présence du domaine transmembranaire putatif en C-terminal similaire à celui de Bcl-2 (Hsu *et al.,* 1997 et 1998 ; Wolter *et al.,* 1997). La structure tridimensionnelle de Bax montre que l'extrémité C-terminale de Bax est repliée dans une poche hydrophobe (Suzuki *et al.,* 2000). Bien que l'hélice α9 soit essentiellement composée d'acides aminés hydrophobes, elle comporte également des acides aminés polaires (Thr172, Thr174, Thr182, Ser184, Thr186). Mis à part la Ser184, tous sont exposés et pourraient contribuer à la solubilité de Bax dans sa

conformation (Cartron *et al.,* 2002b). D'autre part, l'extrémité N-terminale de Bax semble aussi essentielle à la conformation cytosolique de Bax puisque la délétion des 20 premiers acides aminés de Bax conduit à la laocalisation constitutive de Bax à la mitochondrie (Goping *et al.,* 1998 ; Cartron *et al.,* 2002b). Cependant, la localisation cytosolique de Bax ne fait pas l'unanimité puisque d'autres groupes décrivent une localisation mitochondriale constitutive dans les cellules saines (Desagher *et al.,* 1999). Par ailleurs, il est montré que la translocation d'environ 20 % du Bax du cytosol vers la MME est suffisante pour induire l'apoptose (Annis *et al.,* 2001).

Nous et d'autres groupes avons montré que la forme inactive de Bax n'interagit que très faiblement avec la mitochondrie et que la délétion des 20 premiers acides aminés conduit à une association plus forte de Bax à la mitochondrie (Goping *et al.,* 1998 ; Tremblais *et al.,* 1999 ; Cartron *et al.,* 2002a). La nature et la localisation des signaux d'adressage et d'insertion membranaire sont encore vivement débattues. De nombreuses études montrent que l'extrémité C-terminale des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 ou Bcl-xL est essentielle pour leur insertion membranaire et leur fonction anti-apoptotique (pour revue, Schinzel et al., 2004), bien que ce dernier point soit contesté pour Bcl-2 (Borner *et al.,* 1994a). Cependant, d'autres études rapportent que l'extrémité C-terminale de Bax n'interfère pas avec son activité apoptogène ou avec sa localisation mitochondriale (Heimlich *et al.,* 2004 ; Tremblais *et al.,* 1999 ; Priault *et al.,* 2003 ; Cartron *et al.,* 2003b ; Zha *et al.,* 1996b ; Antonsson *et al.,* 2000). Bax est maintenue dans une conformation inactive, grâce à un verrou assuré par l'interaction des extrémités N- et C-terminale de Bax (Nechushtan *et al.,* 1999). Une autre hypothèse de rétention cytosolique, non exclusive, consiste en la séquestration de Bax dans le cytosol par des protéines comme Ku70, Humanin ou 14-3-3 (**revue 1** : Er *et al.,* 2006), *via* des interactions avec l'extrémité N- et/ou C-terminale de Bax. Enfin, certaines études rapportent que la phosphorylation de Bax au niveau de certains résidus (notamment au niveau de la Ser184) peut empêcher la translocation de Bax aux mitochondries (Gardai *et al.,* 2004 ; Xin et Deng, 2005, Er *et al.,* 2006). Inversement, certaines protéines pro-apoptotiques à BH3 seulement, comme Bid, induisent l'insertion de Bax dans la mitochondrie. tBid (Bid tronqué) induit des changements conformationnels de Bax qui conduisent à la dimérisation et l'insertion de Bax dans la MME (Eskes *et al.,* 2000 ; Desagher *et al.,* 1999).

Les études structurales sur Bax (Suzuki *et al.,* 2000) montrent que cette protéine est constituée de 9 hélices α qui forment une poche hydrophobe dans laquelle un peptide BH3 d'une autre

protéine peut s'insérer. Ces études montrent aussi que les hélices α5 et α6 de Bcl-xL, Bcl-2 et Bax sont structuralement similaires au domaine formant les pores des colicines A/E1 et des toxines diphtériques (Schendel *et al.,* 1998). Ces derniers résultats suggèrent que Bcl-xL, Bcl-2 et Bax pourraient former des canaux ioniques et permettre ainsi la perméabilisation de la MME au cours de l'apoptose (Schendel *et al.,* 1998). En accord avec ces résultats, il a été démontré que Bax forme un canal ionique dans des membranes artificielles dont l'activité électrique est associé aux hélices α5 et α6 (Nouraini *et al.,* 2000 ; Heimlich *et al.,* 2004). En absence de signal de mort, Bax n'est pas insérée dans la MME, ce qui est corrélé à la répression imposée par le domaine d'adressage en N-terminal de Bax (région correspondant aux 20 premiers acides aminés) appelé ART (Apoptosis Regulating Targeting) (Goping *et al.,* 1998). Il a été postulé que les domaines N- et C-terminal de Bax coopèrent ensemble pour maintenir Bax sous une conformation cytosolique inactive (Goping *et al.,* 1998 ; Nechushtan *et al.,* 1999). Nous avons montré au laboratoire que l'hélice α1 de Bax, qui suit immédiatement le domaine ART, porte le signal d'adressage à la MME, puisqu'elle est capable d'induire l'adressage à la mitochondrie d'une protéine cytosolique (Hα1-RFP) (Cartron *et al.,* 2003b). En outre, cette protéine chimérique inhibe, à l'inverse d'une protéine chimérique fusionnée à l'hélice α9 (RFP-Hα9), l'association de Bax avec la mitochondrie (Cartron *et al.,* 2003b). La construction Hα1-RFP s'associe aux mitochondries mais est sensible à un traitement alcalin, suggérant que l'hélice α1 n'est pas un domaine transmembranaire mais seulement un domaine d'adressage. Nous et d'autres groupes avons montré que la délétion de l'extrémité C-terminale hydrophobe de Bax (correspondant à l'hélice α1) ne modifie pas la localisation intracellulaire de Bax (Tremblais *et al.,* 1999 ; Oliver *et al.,* 2000 ; Priault *et al.,* 2003 ; John *et al.,* 2002 ; Shi *et al.,* 1999). En revanche, la délétion des extrémités N- et C-terminal augmente la translocation de Bax à la mitochondrie (John *et al.,* 2002 ; Cartron *et al.,* 2003b). Ces résultats suggèrent que l'extrémité N-terminal de Bax, et non l'extrémité C-terminale, est impliquée dans la translocation de Bax à la mitochondrie.

Schinzel et coll. (2004) montrent que lors de la surexpression de Bax, les cellules meurent par un mécanisme qui nécessite l'extrémité C-terminale de Bax et la translocation de la protéine Bax au voisinage des mitochondries (mais pas à la MME) où elle forme un cluster avec Bak. Notons que cette structure est similaire à celle observée à un stade plus tardif de l'apoptose (Nechushtan *et al.,* 2001). Dans cette même étude, les auteurs observent que la protéine Bax

délétée de son extrémité C-terminale forme des agrégats dans le cytosol, empêchant ainsi la translocation de cette protéine à la mitochondrie. Il est probable que sous certaines conditions physiologiques, comme la surexpression de Bax induite par p53 ou l'avancement de l'apoptose à un stade plus tardif, l'extrémité C-terminale de Bax puisse jouer un rôle dans la formation de clusters de Bax/Bak. Par ailleurs, Schinzel et coll. montrent que lorsque l'on étend le domaine C-terminal aux 23 derniers acides aminés de Bax, ce domaine est alors capable d'adresser une protéine cytosolique à la mitochondrie. Cependant, il n'est apporté aucune précision quant au rôle de ces 3 acides aminés supplémentaires dans l'adressage de Bax à la mitochondrie. En outre, ces mêmes auteurs rapportent qu'une proline située à l'extrémité C-terminale de Bax (Pro168) est essentielle à la translocation de Bax à la mitochondrie, ce qui est en accord avec nos résultats. Cependant, en opposition à ces résultats, nous montrons que la substitution de cette proline par une valine (Pro168Val) conduit à la translocation de Bax à la mitochondrie (Cartron *et al.,* 2005). Cette divergence pourrait être due à des conditions expérimentales différentes, mais nos résultats sont en accord avec un changement conformationnel classique induit par les propriétés de rupture d'une structure hélicoïdale par la proline (Sansom et Weinstein, 2000). L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'extrémité C-terminale de Bax est impliquée dans le contrôle de la conformation de Bax et/ou dans sa solubilité plutôt que dans son adressage à la MME.

Nos récents résultats montrent, une fois de plus, que l'extrémité C-terminale de Bax n'est pas essentielle à son activité apoptotique, puisque la protéine Bax délétée de son extrémité C-terminale (BaxΔC) est transloquée à la mitochondrie après induction de l'apoptose et induit le relargage de cytochrome *c* (**article 1** : Er *et al.,* soumis). Nous montrons aussi que BaxΔC est présent sous forme monomérique dans le cytosol des cellules, mais aussi au niveau mitochondrial. Ces résultats confirment l'hypothèse que l'extrémité C-terminale de Bax n'est pas le domaine d'adressage à la mitochondrie et n'est pas essentielle à son activité apoptotique. Une étude récente suggère que l'extrémité C-terminale de Bax est impliquée dans l'hétéro-dimérisation avec Bcl-xL (Jeong *et al.,* 2004). Ces auteurs montrent en effet que la délétion de l'extrémité C-terminale de Bax favorise son hétéro-dimérisation avec Bcl-xL. Une observation similaire est rapportée dans une étude de co-expression de Bax et de Bcl-xL dans la levure (Arokium *et al.,* 2004). Ces dernières observations suggèrent que l'extrémité C-terminale des membres de la famille Bcl-2 pourrait accomplir des fonctions complexes et variées.

D'autre part, une étude rapporte que les résidus Pro13 et Ile19 au niveau de l'hélice hα1 sont dissimulés dans la forme cytosolique de Bax mais deviennent accessibles aux anticorps après insertion membranaire au cours de l'apoptose (Hsu et Youle, 1998), soulignant ainsi l'implication de l'extrémité N-terminale dans le changement conformationnel de Bax et l'adressage mitochondriale. Cette hypothèse a été renforcée par une autre étude qui rapporte qu'une séquence située en N-terminale de Bax, appelée ART, régule la translocation de Bax aux mitochondries (Goping *et al.,* 1998). En outre, nous montrons que Bax ψ, une isoforme naturelle de Bax qui est délétée du domaine ART, est constitutivement mitochondriale et est hautement apoptogène (Cartron *et al.,* 2002b).

Nous proposons un modèle structural où les domaines N- et C-terminal de Bax sont impliqué dans le contrôle de l'adressage et l'insertion de Bax dans la MME (Cartron *et al.,* 2005). Dans ce modèle, deux prolines sont impliqués dans le changement de conformation de Bax de la forme inactive à la forme active. Ces deux prolines sont exposées sur la structure définie par RMN et sont toutes deux situées à proximité d'une hélice α (hélice α1 pour la Pro13 et hélice α9 pour la Pro168) (Suzuki *et al.,* 2000), et pourraient être impliquées dans le changement conformationnel. De façon intéressante, ces deux prolines sont retrouvés dans une séquence consensus (G*X*PT) (Suzuki *et al.,* 2000 ; Oltvai *et al.,* 1993), suggérant qu'un changement de conformation *cis/trans* de ces prolines pourrait être impliqué dans l'acquisition de la conformation active de Bax. Il a été montré que des séquences similaires comme G*X*P introduisent des distorsions dans des hélices α et sont responsables de changements conformationnels importants pour la signalisation de canaux ioniques et de récepteurs couplés à la protéine G (Sansom et Weinstein, 2000). La dernière hypothèse a été confirmée par des études de mutagenèse qui montrent que la mutation Pro13Val induit l'adressage de Bax à la mitochondrie et augmente son activité pro-apoptotique, alors que la mutation Pro168Val augmente son insertion mitochondriale (Cartron *et al.,* 2005). Nous montrons que l'hélice hα1 est exposée dans Bax ψ et Bax Pro13Gly et qu'une mutation dans l'hélice α1 (Leu26Gly) diminue significativement leur association avec la mitochondrie et leur activité apoptotique, de façon indépendante à l'extrémité C-terminale de Bax (Cartron *et al.,* 2005). De manière similaire, la substitution des Pro8 et Pro13 par une Gly stimule la translocation de Bax à la mitochondrie dans la levure (Arokium *et al.,* 2004).

Les prolines sont associées à la rupture des structures en hélice, mais sont aussi impliquées dans le contrôle de la phosphorylation des résidus Thr/Ser précédents ces prolines. Il a été

suggéré que la Pro168 est la cible d'une prolyl-*cis*/*trans*-isomerase qui pourrait être impliquée dans le changement d'orientation de l'hélice hα9 (Schinzel *et al.,* 2004). La distorsion hélicoïdale causée par l'isomérisation de la proline pourrait induire l'exposition de l'hélice α1 dans le cas de la Pro13 et des hélices α5 et α6 dans le cas de la Pro168, et ainsi contrôler l'adressage et l'insertion de Bax, respectivement. Pour l'adressage de Bax à la mitochondrie, une étape supplémentaire dans le désengagement de l'hélice hα1 pourrait être assurée par des liaisons électrostatiques entre l'Asp33 et la Lys64 (Cartron *et al.,* 2005). La rupture de cette liaison serait suffisante pour provoquer l'ouverture de la conformation de Bax, notamment l'exposition de l'hélice α1 et du domaine BH3, ce qui serait suffisant pour son adressage mitochondrial, mais inhiberait son activité *in vitro* (Cartron *et al.,* 2005). Par ailleurs, nous montrons que des mutations dans le pore putatif de Bax (hélices α5α6) n'influent pas dans l'association de Bax à la mitochondrie, mais inhibent son insertion à la mitochondrie et le relargage de cytochrome *c* (Cartron *et al.,* 2005). L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'extrémité N-terminale de Bax est impliquée dans l'adressage de Bax à la mitochondrie, alors que les hélices hα5α6 sont impliquées dans l'insertion de Bax dans la MME.

En définitive, la conformation de Bax serait sous le contrôle de deux prolines qui seraient impliquées dans la divulgation du signal d'adressage (Pro13 contrôle l'interaction inhibitrice de l'extrémité N-terminale de Bax avec l'hélice α1) ou dans la divulgation du domaine d'insertion membranaire (Pro168 contrôle l'interaction inhibitrice entre l'hélice α9 et les hélices α5α6). La modulation de l'isomérisation de ces prolines serait sous le contrôle de processus physiologiques comme la phosphorylation, le pH intracellulaire ou sous le contrôle de protéines régulatrices. Un contrôle additionnel de la conformation de Bax serait assuré par l'interaction de l'hélice α1 avec l'hélice α2 qui contient le domaine BH3, et tout particulièrement par les ponts salins formés entre l'Asp33 et la Lys64. La structure tridimensionnelle de Bax montre que le domaine BH3 n'est pas caché par l'extrémité N-terminale comme précédemment suggéré par Nechushtan et coll. (1999) mais par l'extrémité C-terminale (Suzuki *et al.,* 2000). Cependant, des simulations moléculaires basées sur la structure tridimensionnelle de Bax montrent que l'Asp33 est à proximité de Lys64, ce qui valide nos observations. En effet, nous avons montré que l'hélice hα1 de Bax semble interagir avec le domaine BH3 de Bid (Cartron *et al.,* 2004a). Nous postulons ainsi que la rupture de cette liaison Asp33-Lys64 induit l'exposition de l'hélice α1, favorisant ainsi l'interaction avec tBid et l'adressage à la mitochondrie. Cependant, l'étape d'exposition de l'hélice α1 est

nécessaire mais pas suffisante pour induire l'activité apoptogène et l'insertion de Bax à la MME. La contrainte conformationnelle exercée par la Pro168 de l'hélice α9 sur les hélices α5α6 doit être aussi levée pour arriver à la conformation active complète de Bax qui permet son insertion à la MME. Ainsi, l'extrémité C-terminale de Bax, qui occupe la poche hydrophobe, contrôle indirectement son adressage mitochondrial et sa dimérisation (Arokium *et al.,* 2004).

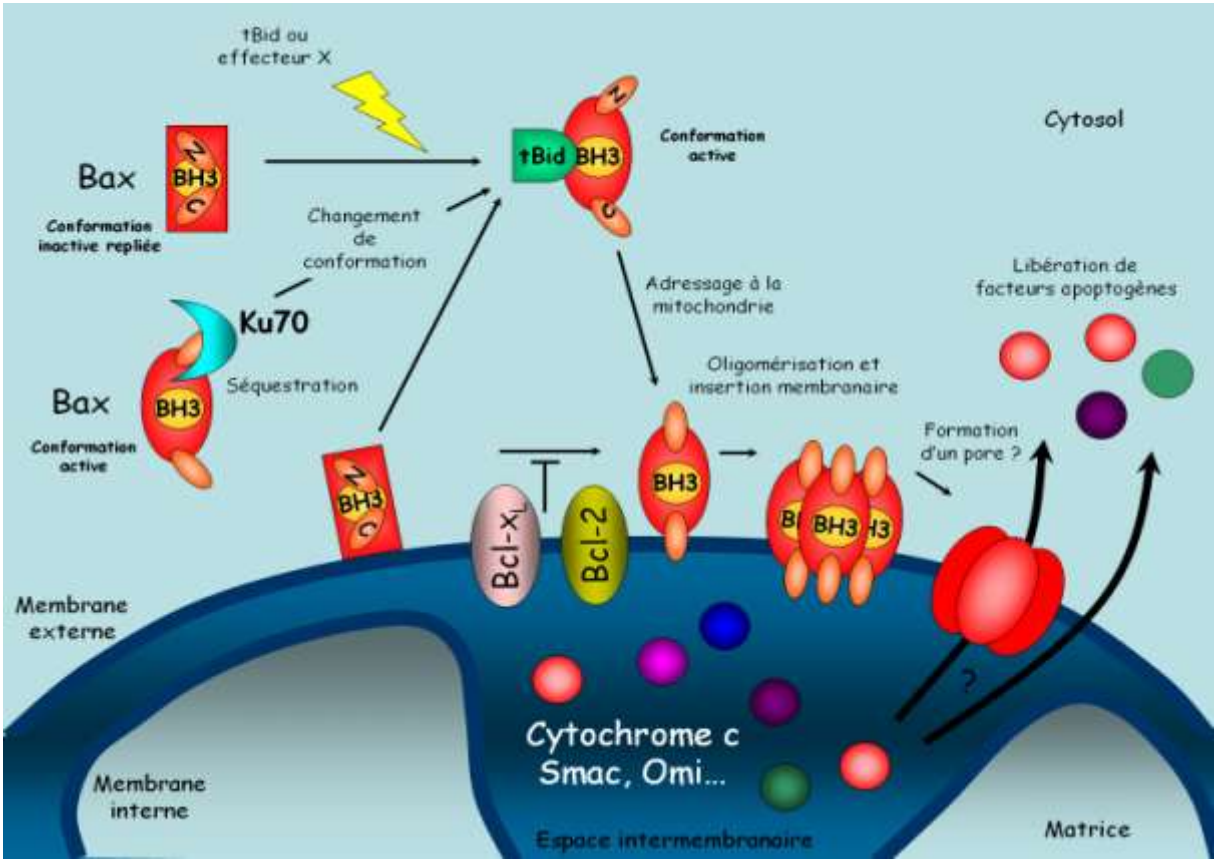


Figure 52 : Représentation schématique de l'activation et de la translocation de la protéine pro-apoptotique Bax au cours de l'apoptose. Cette figure est un schéma qui ne reflète pas la structure réelle de Bax. Bax est maintenu sous forme inactive dans le cytosol ou est séquestré dans le cytosol par des facteurs protéiques (comme Ku70) ou est faiblement associé à la membrane mitochondriale externe (MME). L'ART (Apoptosis Regulating Targeting) est bloqué dans une conformation empêchant l'exposition de l'hélice α1. Suite à un signal de mort, Bax est activé (par tBid ou autre effecteur x) et/ou libéré de Ku70 et subit des changements conformationnels : le mouvement de l'ART autour de la zone flexible se situant entre les résidus P8 et P13 permet l'exposition de l'hélice α1, qui peut alors interagir avec un récepteur mitochondrial putatif, et du résidu D33, qui est libéré de son interaction avec le domaine BH3 de Bax et peut alors interagir avec une protéine à BH3 seulement. Bax est adressée à la mitochondrie par son domaine N-terminal. Le déploiement de l'hélice α9 autour du résidu P168 permet l'exposition des hélices amphipathiques α5 et α6 et la libération de l'hélice α2 contenant le domaine BH3. Bax s'insère dans la MME par ses hélices α5 et α6 et s'oligomérise. Les hélices α2 (domaine BH3) et α9 pourraient participer au processus l'oligomérisation. L'ordre de ces évènements (oligomérisation et insertion) est sujet à discussion. Bax induit ensuite la perméabilisation de la MME, peut-être par la formation de pores protéiques, permettant ainsi le relargage de facteurs apoptogènes (cytochrome *c*, Smac, Omi…) dans le cytosol. Le mécanisme de perméabilisation de la MME n'est pas encore éclairci. L'action de la protéine Bax peut être inhibée par des protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 ou Bcl-xL.

Notons par ailleurs que l'activation de Bax au niveau de la mitochondrie requiert des partenaires supplémentaires, notamment les éléments régulés par c-myc (Soucie *et al.,* 2001 ; Juin *et al.,* 2002).

Pour conclure, l'activité pro-apoptotique de Bax est régulée par la conformation de ses deux extrémités (figure 52). Le domaine N-terminal régule l'adressage de Bax à la mitochondrie alors que le domaine C-terminal est impliqué dans le maintien de la forme inactive de Bax. Le troisième domaine important impliqué dans la translocation de Bax à la mitochondrie est le domaine de pore putatif formé par les hélices $\alpha5\alpha6$ (Nouraini *et al.,* 2000 ; Cartron *et al.,* 2005). Bax semble s'insérer dans la MME suivant le modèle décrit pour les toxines bactériennes (Suzuki *et al.,* 2000 ; Muchmore *et al.,* 1996). Une étude récente montre que les hélices $\alpha5\alpha6$ constituent le domaine transmembranaire de Bax (Heimlich *et al.,* 2004). L'ensemble de ces données suggèrent que l'hélice $\alpha9$ n'est pas le seul domaine impliqué dans l'insertion membranaire de Bax.

II. OLIGOMERISATION DE BAX.

Les membres anti-apoptotiques et pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 neutralisent leurs effets mutuellement, suggérant que les interactions hétérotypiques sont cruciaux dans le contrôle de l'apoptose (Cheng *et al.,* 1996 ; Yin *et al.,* 1994 ; Sedlak *et al.,* 1995). De plus, la formation d'oligomères de haut poids moléculaire par des interactions homotypiques semble être critique dans la décision de mort cellulaire, cependant la composition de ces oligomères régulateurs restent à élucider jusqu'à ce jour. L'activité biochimique des protéines de la famille Bcl-2 a été révélée par la structure de Bcl-xL, première structure tridimensionelle résolue de cette famille de protéines (Muchmore *et al.,* 1996). Remarquablement, la structure de cette protéine anti-apoptotique est semblable à celle des sous-unités formant les pores des colicines et toxines diphtériques. Cette observation a focalisé l'intérêt de la communauté scientifique sur l'association membranaire et la propriété d'insertion membranaire et de formation de pore des protéines de la famille Bcl-2 (Schlesinger *et al.,* 1997 ; Antonsson *et al.,* 1997 ; Schendel *et al.,* 1997 ; Minn *et al.,* 1997). Le relargage de cytochrome *c* de la mitochondrie s'est révélé être sous le contrôle des protéines de la famille Bcl-2 (Liu *et al.,* 1996 ; Yang *et al.,* 1997 ; Acehan *et al.,* 2002), focalisant toute l'attention sur

l'oligomérisation et la formation de pores par les protéines de cette famille. Il a été montré que Bax a la propriété de perméabiliser toute une variété de membranes, incluant notamment les liposomes (Kuwana *et al.,* 2002) dans lesquels de grands oligomères de Bax ont été visualisés (Epand *et al.,* 2002). La décision de mort cellulaire requiert la translocation de protéines de la famille Bcl-2, l'oligomérisation de ces protéines transloquées ou déjà présentes au niveau de la MME et la perméabilisation de la mitochondrie par ces protéines activées. Il est ainsi devenu essentiel de caractériser les protéines de la famille Bcl-2 sous forme active afin d'élucider les mécanismes de l'apoptose.

La forme cytosolique de Bax, tout comme la forme mitochondriale faiblement associée à la MME retrouvée dans les cellules non apoptotiques, est un monomère de 21 kDa. Suite à l'induction de l'apoptose, ce monomère évolue pour former un complexe de haut poids moléculaire (96 à 260 kDa) qui s'insère dans la MME, suggérant que l'oligomérisation de Bax accompagne son insertion mitochondriale (Gross *et al.,* 1998 ; Antonsson *et al.,* 2001 ; Guihard *et al.,* 2004). Ces complexes semblent être des homo-oligomères de 6 à 8 molécules de Bax comme observés dans les expériences de gel-filtration (Antonsson *et al.,* 2001). L'oligomérisation de Bax semble être une étape importante dans l'activation de Bax. Il a été suggéré que la formation d'homo-dimère par Bax est impliquée dans son activation (Hsu et Youle, 1997 et 1998 ; Gross *et al.,* 1998). Les observations de microscopie électronique indiquent que la translocation de Bax à la MME est la première étape de l'activation de Bax, et que l'oligomère associé à la mitochondrie est la structure pro-apoptotique biologiquement active (Nechushtan *et al.,* 2001).

Le comportement de Bax semble être similaire à celle de la toxine bactérienne aérolysine. L'aérolysine est présent sous forme de monomère ou de dimère en solution. Cependant, cette protéine peut s'oligomériser et cette oligomérisation est un pré-requis pour l'insertion membranaire et pour la formation d'un canal (Van der Goot *et al.,* 1993). En outre, les oligomères d'aérolysine qui sont des heptamères sont aussi la forme active dans les membranes (Parker *et al.,* 1994).

Nous avons récemment montré au laboratoire que l'homo-oligomérisation de Bax est sous le contrôle de l'extrémité C-terminale de Bax, mais que cette extrémité C-terminale n'est pas le domaine d'oligomérisation (**article 1** : Er *et al.,* soumis), suggérant que le C-terminal de Bax est un élément stabilisateur du dimère. Nous montrons que BaxΔC (protéine Bax délétée de

ses 20 derniers acides aminés) ne peut pas former des homo-oligomères, ni des oligomères avec Bax. En revanche, la substitution de l'hélice α9 de Bax par le segment équivalent de Bcl-xL induit la capacité d'oligomérisation de Bax. Cependant, BaxΔC est capable d'induire le relargage de cytochrome *c* de la mitochondrie après induction de l'apoptose, indiquant que l'extrémité C-terminale de Bax n'est pas indispensable a sa fonction apoptotique. En outre, nous montrons que BaxΔC ne forme pas d'oligomères dans les cellules *in vitro*. Il est probable que BaxΔC induit la perméabilisation de la MME par un mécanisme différent que celle induite par la forme naturelle. BaxΔC s'insère dans la MME, suggérant que l'extrémité C-terminale de Bax n'est pas le domaine d'ancrage membranaire. Il est possible que l'insertion de nombreuses molécules de BaxΔC déstabilise la MME, sans formation d'oligomères, et induirait ainsi le relargage de cytochrome *c*.

A ce jour, il n'existe que peu d'études concernant les caractéristiques structurales requises pour la formation d'oligomères. Notre travail apporte un premier point de vue dans ce domaine (**article 1** : Er *et al.,* soumis). Dans la suite de ce manuscrit, je vais discuter des hypothèses concernant l'oligomérisation des protéines de la famille Bcl-2, et plus spécifiquement pour le cas de Bax, conduisant à la perméabilisation des mitochondries ou des structures membranaires artificielles.

La dimérisation entre protéines pro- et anti-apoptotiques a fait l'objet de toutes les attentions pour expliquer la sensibilité d'une cellule à divers stimuli apoptotiques. De plus, il a été observé que la mort cellulaire augmente de façon dose dépendante à Bax en présence de Bcl-2 (Oltvai *et al.,* 1993). La dimérisation de Bax permet d'outrepasser la protection apportée par Bcl-2 en perturbant la fonctionnalité mitochondriale (Gross *et al.,* 1998). Cependant, d'autres travaux ont démontré que l'oligomérisation est requise pour l'exercice de son activité mitochondriale. Bax réside uniquement sous forme de monomères dans le cytosol (Antonsson *et al.,* 2001 ; Roucou *et al.,* 2002a et 2002b) et sous l'action de stimuli de mort, plusieurs molécules de Bax se regroupent au niveau de la MME. Encore à ce jour, le nombre de molécules de Bax dans ces oligomères n'est pas clairement défini. Selon différentes méthodes utilisées, quatre molécules de Bax sont nécessaires pour libérer du cytochrome c encapsulé dans des liposomes (Saito *et al.,* 2000), alors que suite à des études de gel-filtration de mitochondries isolées, huit molécules ont été dénombrées (Antonsson *et al.,* 2001).

Le même mode d'action est retrouvé chez son homologue fonctionnel Bak qui est présent au niveau de la MME : en effet, la formation d'oligomère est aussi nécessaire à son activité apoptotique (Antonsson *et al.,* 2001 ; Mikhailov *et al.,* 2003). L'oligomérisation de Bax et Bak est nécessaire au relargage de cytochrome c (Korsmeyer *et al.,* 2000 ; Wei *et al.,* 2001). En outre, la présence de tBid semble être nécessaire à l'oligomérisation des protéines Bax et Bak (Wei et al., 2001).

D'autres équipes sont plutôt favorables à la formation d'agrégats au niveau de la mitochondrie visibles par des analyses en microscopie électronique ou confocale. Plusieurs milliers de molécules de Bax seraient agglutinées aux membranes mitochondriales (Capano et Crompton, 2002 ; Nechushtan *et al.,* 2001).

Une étude a permis de mettre en évidence que l'emploi de détergents non ioniques comme le NP40 ou le TritonX100, utilisés dans des tampons de lyse ou lors d'études d'interactions protéine/protéine *in vitro*, altéraient la conformation de Bax. La protéine Bax est ainsi capable de former des homodimères et des hétérodimères avec Bcl-2 ou Bcl-xL et son extrémité N-terminale est déployée (Hsu et Youle, 1997). En revanche, l'emploi de détergents zwiterioniques comme le CHAPS n'affecte pas la structure de Bax (Antonsson *et al.,* 2001). Nous observons aussi la dimérisation de BaxΔC suite à un traitement au Triton X100 (**article 1** : Er *et al.,* soumis, **figure 6C**), alors que le CHAPS n'induit pas une telle dimérisation. Etonnamment, Bcl-2 et Bcl-xL ne forment pas d'oligomères en présence de détergents comme le Triton X100 (Conus *et al.,* 2000).

Antonsson et coll. (2000) montrent d'une part que certains détergents forcent l'oligomérisation de Bax et d'autre part que la protéine Bax monomérique recombinante, à l'inverse de la protéine oligomérisée, ne forme pas de canaux dans les liposomes, et n'induit pas le relargage de carboxyfluoroscéine de liposomes.
Dans cette étude, le BaxΔC isolé en présence de détergent migre en absence de détergent comme une mixture d'oligomères de 500 à 160 kDa. En présence de 2 % d'octyl-glycoside (OG) dans le tampon de migration, BaxΔC migre comme un oligomère de 160 kDa.
Le Bax non tronqué (« full length ») isolé en présence de détergent migre en absence de détergent dans le tampon de migration comme un oligomère de plus de 500 kDa ; en présence de détergent dans le tampon de migration, il ne migre plus qu'à 250 kDa.

Cependant, le BaxΔC isolé en absence de détergent migre à un poids moléculaire de 22 kDa. Quand le BaxΔC monomérique est pré-incubé avec 2 % d'OG, et qu'il est mis à migrer en présence de 2 % d'OG, la protéine migre avec une masse moléculaire de 160 kDa ; lorqu'il est mis à migrer en absence de détergent, BaxΔC migre comme une mixture d'oligomères de poids moléculaire allant jusqu'à 500 kDa. En outre, le profil d'élution du BaxΔC monomérique pré-incubé avec de l'OG est similaire à celui du BaxΔC isolé en présence de détergent. A l'inverse, le BaxΔC monomérique pré-incubé avec 2 % de CHAPS et analysé en absence de détergent migre comme un monomère de 22 kDa.

Ces résultats montrent que certains détergents, utilisés dans les tampons de lyse et de purification, comme l'OG (et aussi le NP40, le Triton X100 et le *n*-Dodecyl maltoside) peuvent forcer l'oligomérisation, voire l'agrégation, de molécules de Bax ou de BaxΔC. En revanche, le CHAPS ne semble pas avoir d'effet sur l'oligomérisation de Bax.

Par ailleurs, ces auteurs montrent que le BaxΔC monomérique ne présente aucune activité de canal dans les liposomes, pas même en augmentant la concentration de BaxΔC jusqu'à 500 nM, ce qui est une concentration 80 fois supérieure à celle nécessaire pour détecter une activité de canal avec le BaxΔC oligomérique (6 nM). En revanche, quand le BaxΔC monomérique est pré-incubé avec 2 % d'OG, la protéine s'oligomérise et présente une activité de canal. En outre, les auteurs montrent que le BaxΔC isolé sous forme oligomérique additionné à des mitochondries purifiées induit le relargage de cytochrome c. Un résultat similaire est obtenu avec du Bax « full length ». En revanche, le BaxΔC monomérique n'induit pas le relargage de cytochrome *c* dans ces mêmes conditions. Cependant, lorsque le BaxΔC monomérique est pré-incubé avec 2 % d'OG, BaxΔC s'oligomérise et induit le relargage de cytochrome *c* de façon égale à Bax oligomérisé.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que le Bax monomérique n'a pas d'activité de canal et n'induit pas le relargage de cytochrome *c* des mitochondries ou de carboxyfluorosceine des liposomes. Antonsson et coll. (2000) confirment des observations précédemment publiées : Bax est monomérique dans le cytosol (Hsu et Youle, 1998). Il a été montré que les détergents non ioniques induisent l'homo- et l'hétéro-oligomérisation de protéines de la famille Bcl-2 (Hsu et Youle, 1997 et 1998). Antonsson et coll. montrent que l'exposition de Bax à des détergents spécifiques induit son oligomérisation, et permet de détecter une activité de canal. De manière similaire, le Bax monomérique dans le cytosol de foie de souris évolue en un complexe lorsqu'il est exposé à l'OG, bien qu'il n'est pas montré que cet oligomère est constitué uniquement de Bax.

Cependant, dans ces types d'expérimentations, on ne peut pas exclure que la combinaison de Bax avec des détergents peut avoir un effet déstabilisant sur les liposomes, et induire ainsi le relargage de carboxyfluoroscéine. Il est notamment dit dans cette étude que l'OG et le Triton X100 influe sur le relargage de carboxyfluoroscéine par les liposomes.
Par ailleurs, l'oligomérisation de Bax semble être un processus irréversible (Antonsson *et al.,* 2000). Quand les détergents sont retirés des échantillons, il n'est pas détecté de dissociation en monomères, et au contraire, les oligomères de Bax forment des agrégats. En revanche, lorsque les détergents sont rajoutés aux échantillons, les oligomères précédemment observés réapparaissent, suggérant que la formation des agrégats est un processus réversible. La modification des propriétés de Bax oligomérisé par rapport au Bax monomérique suggère que l'exposition à des détergents induit des changements conformationnels. Des changements de conformation sont aussi observés lors de l'activation induite pat t-Bid (Desagher *et al.,* 1999). L'agrégation du Bax oligomérisé suit à un traitement avec des détergents suggère que les domaines hydrophobiques de Bax sont démasqués et exposés, ce qui faciliterait l'insertion de la protéine dans les membranes lipidiques. Cette dernière hypothèse est confirmée par les analyses de western-blot qui montrent que le Bax oligomérisé s'associe plus facilement avec la mitochondrie que le Bax monomérique (Antonsson *et al.,* 2000). En outre, la protéine utilisée dans l'étude d'Antonsson et coll. est délétée de sa partie C-terminale, suggérant que les changements conformationnels observés au cours de l'apoptose impliquent d'autres domaines ou des domaines additionnels.

En absence de détergent, Bax requiert des membranes (liposomes contenant des cardiolipines ou mitochondries) pour s'oligomériser et s'activer (Kuwana *et al.,* 2002). De plus, il est suggéré que Bcl-xL inhibe Bax qu'en présence de lipides similaires dans les membranes (Kuwana *et al.,* 2002). Cependant, l'importance des cardiolipines dans ce processus est controversée. Dans la levure, les cardiolipines ne semblent pas être essentiels à la mort cellulaire induite par Bax (Iverson *et al.,* 2004). En outre, la quantité précise de cardiolipine dans la MME n'est pas connue, et si elles sont présentes, elles le sont au mieux en très faible quantité. Les expériences de marquage immunologique à l'or suggèrent que les cardiolipines de le MME sont concentrées au niveau de points de contact entre la MMI (membrane mitochondriale interne) et la MME où il a été suggéré que Bax et Bid s'associent, et ces sites seraient suffisamment concentrés en cardiolipine pour permettre l'association de ces protéines (Lutter *et al.,* 2000 et 2001). Alternativement, il pourrait exister des protéines mitochondriales

qui concentrent les cardiolipines, permettant ainsi l'insertion et l'activation de Bax et/ou Bak dans la MME et la perméabilisation de la mitochondrie.

Le domaine BH3 a été initialement impliqué dans l'interaction spécifique entre membres de la famille Bcl-2 (Sattler *et al.,* 1997 ; Wang K *et al.,* 1998). De nombreuses études de mutagenèse ont confirmé cette hypothèse (Letai *et al.,* 2002 ; Sattler *et al.,* 1997 ; Tzung *et al.,* 2001 ; Degterev *et al.,* 2001 ; Losonczi *et al.,* 2000). Bien que central dans la régulation de l'apoptose, ce site de liaison unique ne peut assurer qu'une dimérisation spécifique. Les oligomères de haut poids moléculaire responsables de la perméabilisation membranaire et du relargage de facteurs apoptogènes de la mitochondrie requièrent au moins deux sites d'interaction par protéine de la famille Bcl-2 (Antonsson *et al.,* 2000 et 2001). Encore aujourd'hui, les contraintes structurales nécessaires à l'oligomérisation des protéines de la famille Bcl-2 restent à déterminer. L'homo-oligomérisation de Bax et de Bak, qui est nécessaire au relargage de cytochrome c, semble être un excellent candidat au mécanisme d'échange de domaine (« domain swapping ») (Rousseau *et al.,* 2004 ; Kundu et Jernigan, 2005).

L'échange de domaine ou « domain swapping » est un phénomène bien connu en biologie structurale, qui peut être décrit comme l'adoption de deux repliements différents par une même séquence (Murray *et al.,* 1995). Ce phénomène joue un rôle important dans le mécanisme d'oligomérisation de certaines protéines (Liu et Eisenberg, 2002 ; Newcomer, 2002 ; Xu D *et al.,* 1998 ; Schlunegger *et al.,* 1997). Le processus de « domain swapping » peut être décrit ainsi : le domaine d'une sous-unité est remplacé par le même domaine d'une autre sous-unité (Bennett *et al.,* 1995 ; Schlunegger *et al.,* 1997). La sous-unité monomérique dans le dimère ou l'oligomère est toujours amenée à s'imbriquer avec l'autre sous-unité monomérique, et cet état du monomère est généralement appelé « état monomérique ouvert » et l'interface est appelée « interface ouverte » (figures 53). A l'inverse, le monomère, à l'état monomérique non couplé avec une autre sous-unité, est indépendant et plus compact : cet état est appelé « état monomérique fermé », et l'interface est appelée « interface fermée ». Bien que ce phénomène de « domain swapping » ait été observé dans de nombreuses protéines (Liu et Eisenberg, 2002), le mécanisme de ce processus reste encore peu connu. Parmi ces protéines, la toxine diphtérique est un bon exemple représentatif, étant donné que sa structure résolue nous permet d'aller plus loin dans les investigations et qu'il s'agit bien dans ce cas d'un échange de domaine et non d'un échange de segment entre deux sous-unités. La toxine

diphtérique est une protéine modèle qui subit le « domain swapping » pour former des dimères (Bennett *et al.,* 1994a et 1994b ; Bennett et Eisenberg, 1994). Suc1, un membre de la famille Cks de protéines régulatrices du cycle cellulaire, est une autre protéine qui dimérise par échange de brin β (figure 54) (Rousseau *et al.,* 2004).

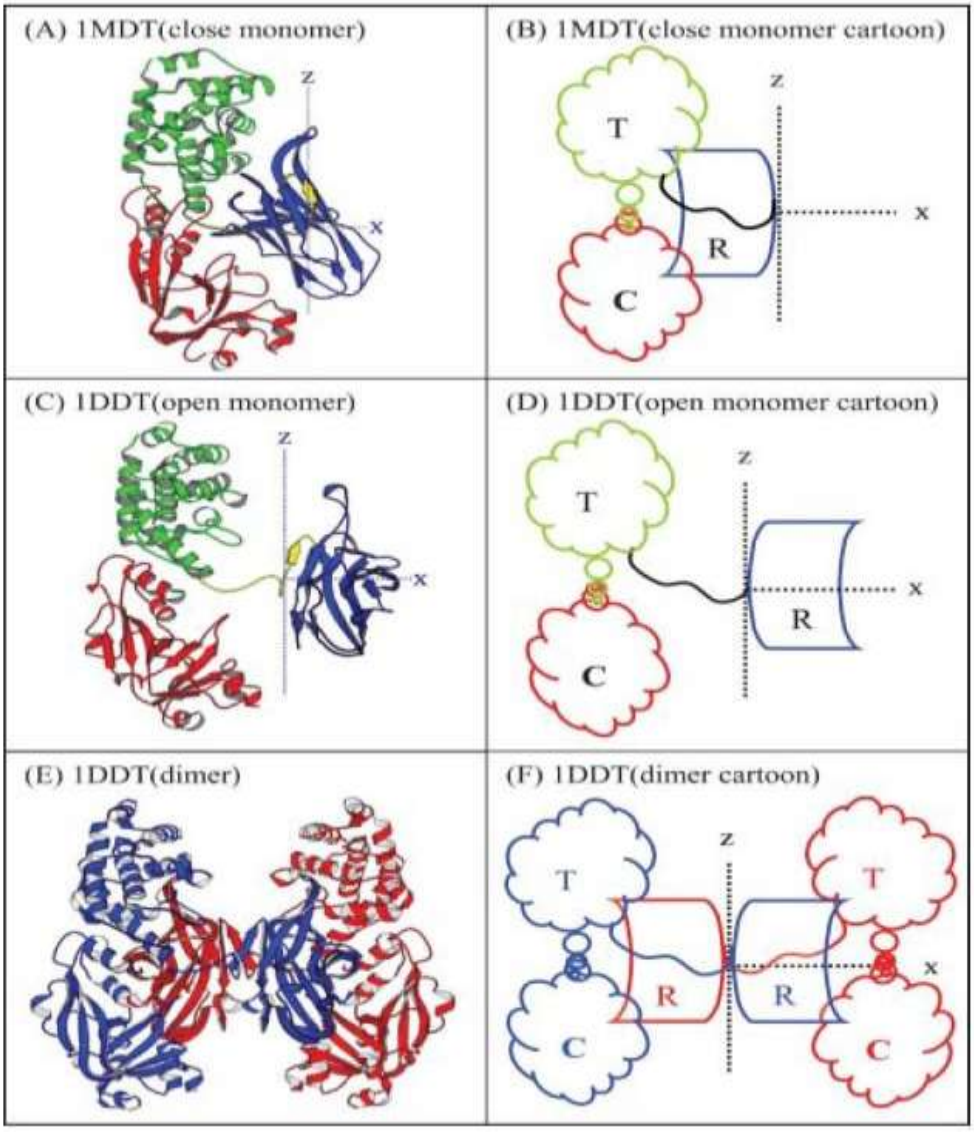


Figure 53 : Echange de domaine ou « domain swapping » dans la toxine diphtérique (figure tirée de Kundu et Jernigan, 2004). La toxine diphtérique (DT) fonctionne au travers de ces 3 domaines : le domaine catalytique (C, en rouge sur la figure), le domaine de translocation (T, en vert sur la figure), et le domaine récepteur (R, en bleu sur la figure). (A) Monomère de la toxine diphtérique dans l'état monomérique (MDT) (l'état « fermé »), (B) représentation schématique de MDT. (C) Structure du monomère de la toxine diphtérique dans l'état dimérique (DDT) (l'état "ouvert"), (D) représentation schématique de DDT. (E) Dimère dans l'état dimérique (deux monomères en état "ouvert" imbriqués l'un dans l'autre), (F) représentation schématique correspondante à (E). Pour l'ensemble de ces structures, il y a un axe de rotation perpendiculaire au segment de liaison des monomères (axe z) autour duquel il y a une simple rotation au cours de la transition vers l'état dimérique avec une légère rotation autour de l'axe x.

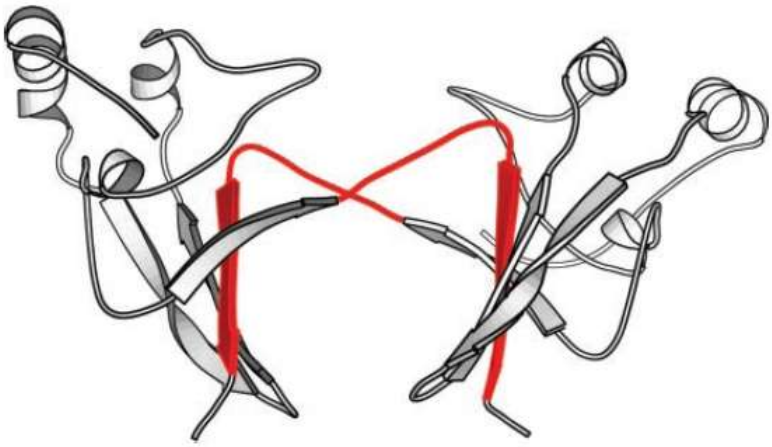


Figure 54 : Echange de domaine ou « domain swapping » dans Suc1 (figure tirée de Rousseau *et al.,* 2004). Ce schéma représente les structures de deux monomères formant un dimère de Suc1 par échange de domaine. Les domaines échangés (brins β et boucles) sont représentés en rouge. Chaque sous-unité du dimère est superposable l'une à l'autre, mis à part la boucle qui connecte les brins échangés au reste de la structure.

Sur la bases de ces données sur la toxine diphtérique et connaissant la similarité de structure entre la toxine diphtérique et Bax, nous pouvons imaginer un mécanisme semblable pour l'oligomérisation de Bax au cours de l'apoptose. Il est probable que l'extrémité C-terminale de Bax intervienne dans ce type de processus d'échange de domaine : le C-terminal pourrait être un domaine d'échange, permettant ainsi l'oligomérisation de Bax, sans être directement le domaine de dimérisation de Bax. Cependant, le domaine C-terminal de Bax ne porte pas les caractéristiques structurales nécessaires à la mise en œuvre d'un tel phénomène de « domain swapping » (Newcomer, 2002). Il se peut alors que le C-terminal n'intervienne que pour stabiliser ce type de structure.

Il a été proposé que la perméabilisation de la MME a lieu par oligomérisation de Bax avant ou concomitamment avec l'insertion des hélices α5 et α6, identifiées comme domaine de pore putatif sur la base de similarité structurale avec la région formant les pores des toxines diphtériques. Bien que structuralement similaire, l'importance de l'oligomérisation, la taille des oligomères et le mécanisme de formation des pores restent encore incertains (Sharpe et London, 1999 ; Steere et Eisenberg, 2000). La colicine, une autre protéine structuralement similaire à Bax, s'insère dans les membranes par un mécanisme bien défini. Cependant, le canal ionique formé est beaucoup plus petit que celui qui pourrait être formé par Bax (Lindeberg *et al.,* 2000) et le mécanisme n'est compatible avec les propriétés biochimiques de Bax. La Perfringolysine O, une protéine qui elle n'est pas structuralement similaire à Bax,

forme de larges pores dans les membranes par un mécanisme bien défini qui se divise en 3 étapes (figure 55) : (i) association de la toxine aux membranes, (ii) oligomérisation en surface des membranes et (iii) changement de conformation concerté pour la formation d'un pore (Heuck *et al.,* 2000). Dans ce dernier cas, l'oligomérisation avant la formation du pore semble être nécessaire afin que l'insertion de la protéine dans les membranes puisse induire un réarrangement suffisant des lipides membranaires pour former un pore.

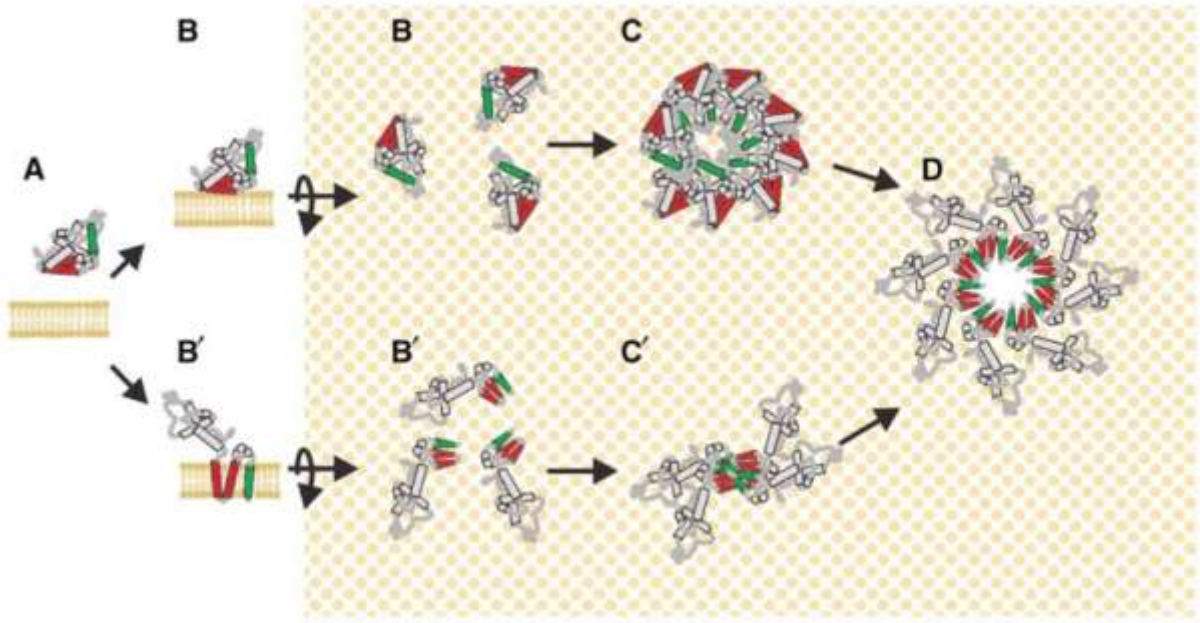


Figure 55 : Comparaison de deux modèles de formation de pores par Bax (figure tirée de Annis *et al.,* 2005). (A) en condition non apoptotique, Bax est un monomère cytoplasmique. Dans le modèle basé sur les toxines bactériennes, (B) Bax s'associe à la périphérie des membranes ou s'insère dans la membrane par son hélice α9. (C) Les monomères associés à la membrane oligomérisent pour former une structure capable de former un pore membranaire. (D) Un changement conformationnel concerté permet l'insertion des hélices α5α6 et α9 (sauf si ce dernier est déjà inséré) et la réorganisation des lipides pour former un trou dans la membrane. Dans le modèle basé sur l'oligomérisation de Bax dans les membranes, (B') Bax s'insère par ses hélices α5α6 et α9 dans les membranes sous forme monomérique. (C') Les monomères subissent des changements conformationnels initiant ainsi l'oligomérisation. Dans les cellules Myc-/-, le processus semble être bloqué à cette étape. (D) Les changements conformationnels continuent et réorganisent la bicouche lipidique afin de former un grand trou dans la membrane. Afin de simplifier, le pore formé représenté ici n'est formé que par les hélices α5α6 (en rouge) et α9 (en vert). Cependant, d'autres domaines protéiques et structures lipidiques peuvent contribuer à perméabiliser la membrane. Le nombre de molécules de Bax par pore utilisés dans cette illustration est purement arbitraire.

Contradictoirement, sur la base d'expériences avec des liposomes et des protéines recombinantes purifiées, la formation de pores lipidiques avec Bax a été proposée comme une autre alternative à la perméabilisation de la MME (Kuwana *et al.,* 2002; Terrones *et al.,* 2004). Cependant, ces modèles de perméabilisation de la MME ne sont pas pertinents,

puisque ces derniers auteurs ont utilisés un excès moléculaire de t-Bid pour induire la formation de leurs pores. Or il a été montré que la perméabilisation de la MME par Bax ou Bak dans les cellules peut être induite par des quantités stoechiométriques de t-Bid 100 fois moins supérieures (Ruffolo et Shore, 2003).

Dans l'étude d'Annis et coll. (2005), le marquage chimique des cystéines de mutants de Bax par un agent modifiant spécifiquement les cystéines et imperméable aux bicouches montre que Bax s'insère dans les membranes par son domaine de pore putatif (les hélices α5 et α6), mais aussi par son domaine C-terminal (hélice α9), avant de s'oligomériser et de perméabiliser la MME. Ces résultats suggèrent que la perméabilisation de la MME par Bax résulte, à l'inverse de la plupart des protéines formant des pores, de l'oligomérisation de monomères transmembranaires, plutôt que de l'insertion concertée des domaines de pore d'un oligomère préformé (figure 55).
Nous avons montré très récemment que Bax s'oligomérise au cours de l'apoptose au niveau de la MME (**article 1** : Er *et al.,* soumis), mais nous ne détectons jamais d'oligomères de Bax dans le cytosol des cellules, et ceci à différents temps après induction de l'apoptose. Ces résultats suggèrent que les oligomères de Bax ne se forment qu'à proximité ou dans la MME. Cependant, nous n'avons pas de preuves formelles quant à l'ordre des évènements d'insertion et d'oligomérisation de Bax.

Il a été précédemment montré que la perméabilisation de la MME par Bax est bloquée dans les cellules déficientes en gène *c-myc* (Soucie *et al.,* 2001). La perméabilisation de la MME est bloquée par des modifications au niveau de la mitochondrie qui empêchent l'oligomérisation de Bax.
Dans l'étude d'Annis et coll. (2005), il est suggéré que dans les cellules *myc-/-* le défaut de perméabilisation de la MME est intrinsèque à la mitochondrie : soit ces mitochondries contiennent moins d'éléments régulés par c-Myc nécessaires à la formation de pores par Bax, soit elles contiennent un élément qui inhibe le relargage de cytochrome *c* en bloquant la formation d'un pore. Néanmoins, dans les cellules *myc-/-* les changements conformationnels de Bax sont bloqués suite à l'association de Bax à la mitochondrie mais avant la perméabilisation de la MME, permettant aux auteurs d'étudier le mécanisme de perméabilisation dans les cellules plutôt qu'en système acellulaire. Ces auteurs observent l'insertion du domaine de pore putatif de Bax dans les membranes en absence de relargage de cytochrome *c*, suggérant que l'insertion de ce domaine dans la MME n'est pas suffisant pour

induire sa perméabilisation. Les auteurs suggèrent en outre que le relargage de cytochrome *c* n'est pas régulé par des modifications de la topologie membranaire de Bax, mais que d'autres changements conformationnels, qui sont bloqués dans les cellules *myc-/-,* sont requis. Afin de déterminer si l'expression de Myc est nécessaire à l'oligomérisation de Bax, les auteurs ont analysé par gel-filtration les mitochondries de cellules *myc-/-* ou *myc+* isolées après un traitement à l'étoposide et solubilisées dans du CHAPS. Ils observent que Bax forme des complexes de haut poids moléculaires dans les cellules exprimant Myc, ce qui est en cohérence avec le relargage de cytochrome *c* induite par Bax dans les cellules exprimant Myc. Cependant, en absence de Myc, Bax reste monomérique au niveau mitochondrial après traitement à l'étoposide. En outre, les auteurs n'observent pas d'hétéro-oligomérisation entre Bax et Bcl-xL. Leurs résultats suggèrent que le défaut d'activation de Bax dans les mitochondries de cellules *myc-/-* a lieu à l'étape de formation d'oligomères de Bax résistants aux détergents.

Récemment, ces auteurs ont montré que la protéine Bax qui n'est pas insérée dans la membrane peut subir des changements conformationnels, détectables avec l'anticorps 6A7 conformation dépendante, de manière réversible et sans oligomérisation (Yethon *et al.,* 2003). Ainsi, il semble que le changement conformationnel détecté par l'anticorps 6A7 induit l'oligomérisation de Bax uniquement si le domaine de pore putatif est exposé avant son insertion dans la membrane. Les auteurs suggèrent alors qu'au cours de l'apoptose, Bax perméabilise la MME *via* des étapes discrètes commençant par l'insertion de monomère de Bax dans la MME, suivie par un changement conformationnel de l'extrémité N-terminale induisant l'oligomérisation de Bax (figure 55). Le mécanisme de réorganisation des lipides lors de la formation du pore est différent de celui impliqué dans la formation de pores par les toxines bactériennes (figure 55).

Cependant, nous avons déjà discuté précédemment que les changements conformationnels de Bax, détectables avec l'anticorps 6A7 conformation dépendante, peuvent avoir lieu avant l'insertion de son domaine de pore putatif dans la MME. Nous pouvons donc proposer une alternative au modèle proposé par Annis et coll. (2005), où les changements conformationnels de l'extrémité N-terminale de Bax ont lieu avant insertion du domaine de pore putatif dans la MME, lorsque Bax est encore faiblement associé à la mitochondrie.

Dans le modèle présenté figure 55, le pore formé par Bax est composé uniquement de molécules de Bax, afin de comparer les différentes étapes avec celles des toxines bactériennes. Cependant, il est tout à fait possible que des lipides ou d'autres protéines

membranaires qui forment des canaux protéiques pré-existants participent à la formation de ce pore (Marzo *et al.,* 1998 ; Epand *et al.,* 2002 ; Kuwana *et al.,* 2002 ; Terrones *et al.,* 2004).

Un autre groupe suggère que Bax s'insère dans les membranes sous forme de monomère et l'environnement membranaire augmente sa capacité à former des oligomères (Schlesinger et Saito, 2006). Ces oligomères de Bax forment ensuite des pores de deux tailles différentes (11 et 22 Å de diamètre). Leur étude en bicouche indique que l'activité de canal formé par Bax dépend de la concentration de Bax, ce qui reflète une oligomérisation dans la membrane. Au cours du temps, les auteurs ont observé que la taille des canaux formés par Bax et Bcl-2 atteignent des tailles de l'ordre du nano-Siemen dans les bicouches lipidiques (Schlesinger *et al.,* 1997). Ces résultats n'ont pas pu être reproduits dans les liposomes. Cette activité semble similaire à celle observée par d'autres groupes dans les mitochondries (Dejean *et al.,* 2005 ; Martinez-Caballero *et al.,* 2004 et 2005 ; Guo *et al.,* 2004). Bax seul semble suffire à former ce pore, qui permet le passage de cytochrome *c* à travers la bicouche lipidique. Au cours du passage du cytochrome c, les auteurs observent une augmentation de la taille du pore formé par Bax (28 Å de diamètre), suggérant une interaction directe du cytochrome *c* avec Bax lors du transit à travers le pore (Saito *et al.,* 2000). Les conclusions de ces auteurs suggèrent aussi que l'environnement membranaire, incluant la composition en lipides et en protéines membranaires, peut avoir un effet direct sur l'activation du pore de Bax et sur sa taille. Notamment, il a été rapporté que les cardiolipines augmentent la formation de pore de Bax (Kuwana *et al.,* 2002). Dans les mitochondries, il a été observé que tBid, Bcl-xL, Bcl-2 ou VDAC affecte l'activité du pore de Bax (Korsmeyer *et al.,* 2000 ; Cheng *et al.,* 2003 ; Roucou *et al.,* 2002a). En outre, il a été montré que des micelles de détergent peuvent être utilisés pour activer Bax (Suzuki *et al.,* 2000 ; Antonsson *et al.,* 2000 ; Epand *et al.,* 2004). Par ailleurs, il a été montré que Bax et Bak peuvent former des oligomères homotypiques dans la MME (Mikhailov *et al.,* 2001 et 2003) : la réorganisation de Bak et le relargage de cytochrome *c* nécessitent Bax et Bcl-2 inhibe l'oligomérisation de Bax dans la MME.

III. ASSOCIATION DE BAX A LA MITOCHONDRIE ET PERMEABILISATION MITOCHONDRIALE.

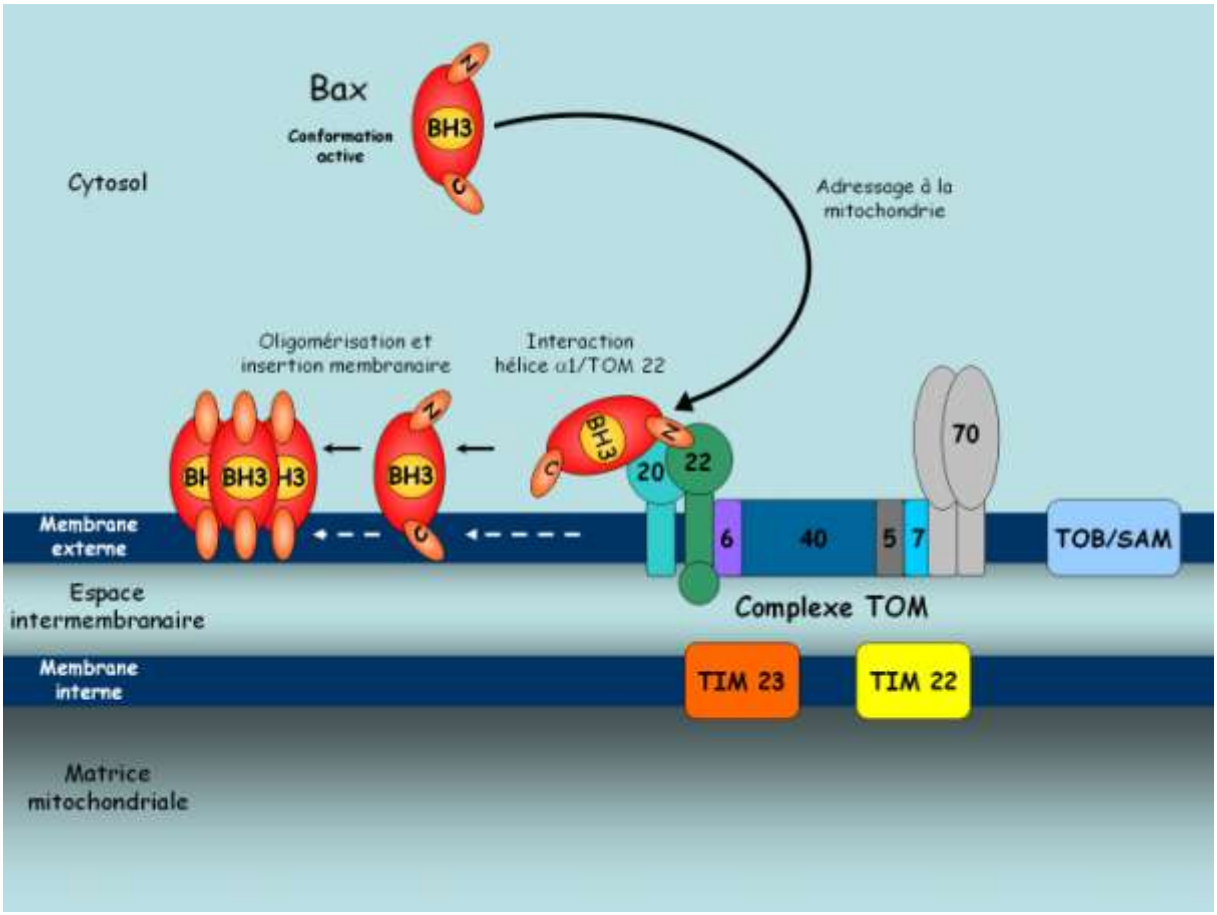


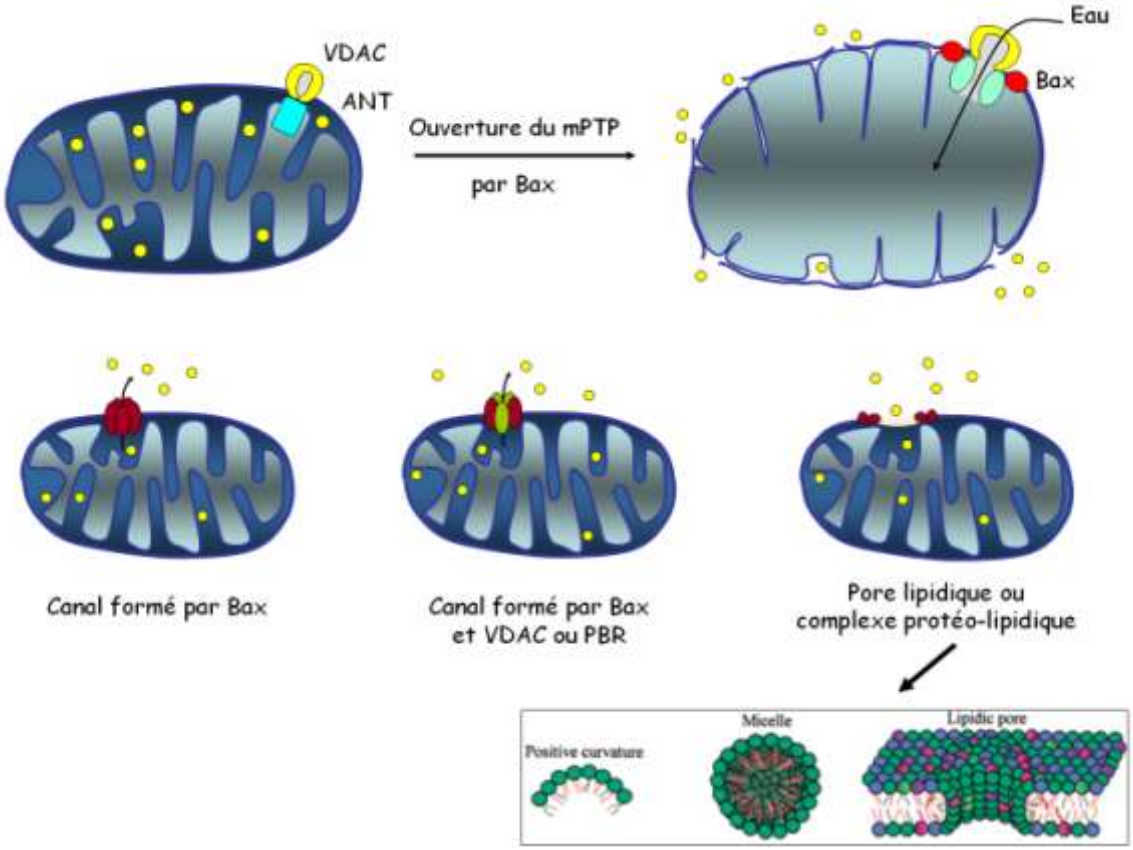
Figure 56 : Représentation schématique de l'association de Bax activé avec la mitochondrie *via* TOM22 au cours de l'apoptose. Cette figure est un schéma qui ne reflète pas la structure réelle de Bax. Bax activé suite à un signal de mort subit des changements conformationnels, notamment l'exposition de son hélice α1 (extrémité N-terminale). Bax est adressé à la mitochondrie, où il interagit avec TOM22, une protéine du complexe TOM, *via* son hélice α1. Bax s'insère ensuite à la MME et s'oligomérise pour induire la perméabilisation de la MME.

L'association de Bax avec la mitochondrie est une étape importante dans l'établissement du processus apoptotique. Nous avons très récemment montré au laboratoire que Bax interagit avec TOM22 *via* son hélice α1 (figure 56), et probablement aussi par son domaine de pore putatif, à savoir les hélices α5 et α6 (**article 2** : Bellot *et al.,* sous presse). L'interaction entre TOM22 et Bax est transitoire (**article 2** : Bellot *et al.,* sous presse, **figure 2**), suggérant que l'association de Bax avec le complexe TOM est une première étape dans la formation d'une autre structure contenant des oligomères de Bax et peut-être d'autres protéines mitochondriales et des lipides (Marzo *et al.,* 1998 ; Epand *et al.,* 2002 ; Kuwana *et al.,* 2002 ;

Terrones *et al.,* 2004). La possible implication de la machinerie d'import mitochondriale dans l'adressage de Bcl-2 a été suggérée par Nguyen et coll. (1993). L'interaction de Bcl-2 avec TOM20, une autre protéine du complexe TOM, a été rapportée plus tard (Motz *et al.,* 2002 ; Schleiff *et al.,* 1997). L'ensemble de ces observations suggèrent que les composants du complexe TOM peuvent jouer un rôle important dans le contrôle de la localisation mitochondriale des protéines de la famille Bcl-2. Restent à déterminer les mécanismes moléculaires impliquant les composants du complexe TOM dans la perméabilisation de la MME par les protéines de la famille Bcl-2.

De nombreux modèles (figure 57) ont été proposés pour la perméabilisation de la MME par Bax au cours de l'apoptose (Martinou et Green, 2001 ; Zamzami et Kroemer, 2001, Chipuk *et al.,* 2006). Ces différents modèles sont exposés dans la **revue 1, § *1.5*** (Er *et al.,* 2006).

Dans le premier modèle (figure 57 A), la membrane mitochondriale interne (MMI) induit ou contrôle la perméabilisation mitochondriale par le mPTP (pore de transition de perméabilité mitochondrial) (Zamzami *et al.,* 2005). L'ouverture de ce pore permet un flux d'ions et d'autres petites molécules dans la matrice mitochondriale, induisant la rupture de la MME et la perméabilisation mitochondriale. Cependant, de récentes études ont remis en question l'importance du mPTP dans la perméabilisation mitochondriale. Des souris déficientes en ANT (Adenine Nucleotide Translocator), un composant du mPTP, peuvent présenter une chute du $\Delta\psi m$ (changement du potentiel mitochondrial), alors que des souris déficientes en Cyclophiline D, un autre composant du mPTP, ne présentent pas de différence pour les différentes formes de mort cellulaire (Baines *et al.,* 2005 ; Nakagawa *et al.,* 2005 ; Kokoszka *et al.,* 2004). Ces résultats suggèrent que le mPTP n'est pas nécessaire à la perméabilisation de la MME.



A

B

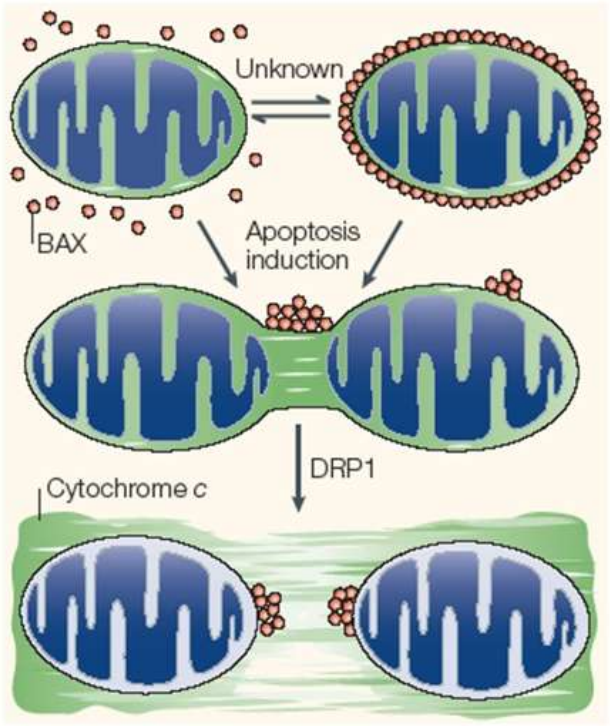


Figure 337 : Modèles de perméabilisation de la membrane mitochondriale externe. La figure du haut (A) est inspirée de Desagher et Martinou, 2000. La figure du bas (B) est tirée de Karbowski *et al.,* 2004.

Alternativement, la MMI pourrait contrôler la perméabilisation de la MME en régulant la phosphorylation oxydative, qui à son tour régule le $\Delta\psi m$ (Ricci *et al.,* 2003). La perméabilisation de la MME est souvent associée à la chute du $\Delta\psi m$, mais la chute du $\Delta\psi m$ induit-elle pour autant la perméabilisation de la MME ou bien est-elle une conséquence de la perméabilisation mitochondriale ? La rupture du $\Delta\psi m$ au cours de la phosphorylation oxydative conduit à la génération de ROS (espèce oxygénée réactive) qui induisent la perméabilisation de la MME par l'intermédiaire de facteurs cytosoliques encore non identifiées. La production de ROS au cours de l'apoptose est souvent la cause du clivage caspase-dépendant du complexe I de la chaîne respiratoire et peut être ainsi considérée comme un sous-produit de la perméabilisation de la MME plutôt que d'être la cause de la perméabilisation mitochondriale (Ricci *et al.,* 2003 et 2004). D'autre part, il n'y a aucune preuve évidente que la chute du $\Delta\psi m$ puisse induire directement la perméabilisation de la MME. La phosphorylation oxydative continue après perméabilisation mitochondriale : en effet, en absence d'activation de caspase, non seulement le $\Delta\psi m$ peut être régénéré, mais encore la production d'ATP cellulaire est maintenue (Ricci *et al.,* 2003 et 2004 ; Waterhouse *et al.,* 2001).

La discrimination de la MMI, et donc de la matrice mitochondriale, dans le processus de perméabilisation de la MME a été démontrée par Kuwana et coll. (2002) qui observent, par une approche réductionniste, que seule la MME est impliquée dans la perméabilisation mitochondriale. Les auteurs ont montré que des vésicules constitués de lipides des membranes mitochondriales libèrent leur contenu en présence de Bax activé. Il est suggéré que le relargage des protéines de l'espace intermembranaire requiert la présence de cardiolipine, un lipide spécifique aux membranes mitochondriales (Kuwana *et al.,* 2002), et qu'aucune autre protéine n'est nécessaire au relargage du contenu des liposomes. Ces observations sont en faveur d'un mécanisme où la perméabilisation de la MME est induite par Bax et/ou Bak activé qui forme un pore dans la membrane pour permettre le relargage de cytochrome *c* (figure 57 A). Cependant ce modèle simplifié ne reflète probablement pas la complexité du processus de perméabilisation de la MME, qui peut nécessiter la présence d'autres protéines de la MME pour permettre la formation de pore protéo-lipidique associant Bax (figure 57 A). Cependant, l'importance des cardiolipines dans le processus de perméabilisation de la MME est sujette à controverses. En effet, les cardiolipines ne semblent pas être nécessaires à la mort cellulaire induite par Bax dans la levure (Iverson *et al.,* 2004). En outre, les quantités exactes de cardiolipines dans la MME ne sont pas connues, et ne sont présentes qu'en très faible

quantité au mieux. Des expériences de marquage à l'or colloïdal suggèrent que les cardiolipines sont concentrées au niveau de points de contact entre la MMI et la MME, permettant à Bax et Bid de s'insérer et d'induire la perméabilisation de la MME (Lutter *et al.,* 2000 et 2001). Alternativement, il pourrait exister une ou plusieurs protéines mitochondriales qui concentrent la cardiolipine à certains points pour permettre l'insertion de Bax et/ou Bak dans la MME.

Il existe deux autres modèles de perméabilisation de la MME, compatibles avec la préservation de l'intégrité membranaire de la mitochondrie. Le premier implique des protéines de la MME, en plus des protéines de la famille Bcl-2, dans la régulation directe de la perméabilisation mitochondriale ; le second modèle propose que des protéines de la MME, en plus des protéines de la famille Bcl-2, participe à la perméabilisation mitochondriale mais ne régulent pas ce processus. Par exemple, il a été récemment rapporté que MAP-1 (modulator of apoptosis-1), est un effecteur mitochondrial de Bax (Tan *et al.,* 2005). D'autre part, nous avons montré que TOM22 est nécessaire à l'association de Bax avec la mitochondrie (**article 2** : Bellot *et al.,* sous presse). Cependant, les dernières hypothèses de perméabilisation de la MME ne sont pas exclusives, puisque les lipides mitochondriaux peuvent coopérer avec Bax et des protéines de la MME pour former un pore mitochondrial (Newmeyer et Ferguson-Miller, 2003).

A de nombreuses reprises, il a été spéculé que des protéines de la MME régulent la perméabilisation induite par Bax ou Bak à cause de la découverte de leur interaction avec ces dernières protéines. Par exemple, il a été montré que Bcl-2, Bcl-xL, Bak et Bax interagissent avec VDAC (Voltage Dependent Anionic Channel) (Shimizu *et al.,* 2000 ; Ferri *et al.,* 2000 ; Vander Heiden et al., 2000 et 2001). Cependant, VDAC est la protéine la plus abondante de la MME et cette interaction n'est probablement pas physiologique. Au laboratoire, nous n'avons pas observé d'interaction Bax/VDAC (**article 2** : Bellot *et al.,* sous presse). Le groupe de Korsmeyer a suggéré que VDAC2 inhibe l'activation de Bak en le maintenant sous forme monomérique dans la MME (Cheng *et al.,* 2003). Cependant, la décision d'activation ou d'inactivation de Bak ne dépend probablement pas de VDAC2, puisqu'un signal cytosolique, probablement une protéine à BH3 seulement, est nécessaire pour rompre l'interaction VDAC2/Bak (Cheng *et al.,* 2003). De manière similaire, il a été suggéré que le PBR (peripheral benzodiazepine receptor) inhibe la perméabilisation de la MME (Stoebner *et al.,* 2001 ; Castedo *et al.,* 2002). Cependant, l'inhibition pharmacologique du PBR n'est pas suffisant pour induire la perméabilisation de la MME (Castedo *et al.,* 2002). Il est possible

que VDAC2 ou PBR s'associent aux protéines de la famille Bcl-2 (figure 57 A), cependant le signal de perméabilisation de la MME ne peut provenir de la mitochondrie. Il est indispensable que la cellule génère ou réceptionne du milieu extracellulaire un signal pro-apoptotique (détection d'un stress cellulaire, activation des protéines à BH3 seulement par un stimulus de mort, activation de la perméabilisation de la MME par Bax et/ou Bak) qu'elle transmet ensuite à la mitochondrie.

Il existe au moins quatre autres protéines qui pourraient potentiellement participer à la perméabilisation de la MME : DRP-1 (une GTPase), l'endophiline B1 (un lipide-transférase nécessaire à la détermination de la courbure membranaire), Fis-1 (une protéine intégrale de la MME) et Fzo1/Mfn1 (une GTPase transmembranaire) (Perfettini *et al.,* 2005). Ce sont toutes des protéines de fusion/fission des mitochondries. Il a été décrit qu'après activation, Bax et Bak s'unissent aux points de fission qui sont composés de DRP-1 et de mitofusine-2, et que Bax peut interagir physiquement avec l'endophiline B1 dans la MME. Cependant, il a été montré que des formes dominant-négatives de DRP-1 ne bloquent pas la translocation de Bax suite à l'activation par une protéine à BH3 seulement (Frank *et al.,* 2001 ; Karbowski *et al.,* 2002 ; Nechushtan *et al.,* 2001). Encore une fois, le signal responsable de la translocation de Bax vers la MME est généré suite à un stress cellulaire (activation par des protéines à BH3 seulement). Cependant, nous pouvons nous demander quel est le dessein de l'interaction de Bax/Bak avec cette classe de protéines ? Est-ce que ces protéines servent simplement de points d'ancrage à Bax/Bak, ou bien sont-elles impliquées dans la régulation active de la perméabilisation mitochondriale ? Après activation, Bax doit être capable de cibler la membrane intracellulaire appropriée (la MME) afin d'engager le processus apoptotique, et ces protéines de fusion/fission pourraient servir de points d'ancrage dans la MME. Or cette hypothèse n'est pas valable pour Bak qui est constitutivement mitochondrial. Cependant, il est possible que ces protéines régulatrices de la dynamique mitochondriale aient évolué pour participer à la perméabilisation de la MME en dirigeant l'action de Bax et Bak au niveau des régions appropriées de la MME (figure 57 B). Encore une fois, cette interaction à elle-seule ne permet pas de décider de la perméabilisation mitochondriale. Un autre aspect potentiel de ce scénario est rattaché à la nécessité de lipides spécifiques pour la perméabilisation induite par Bax. Comme discuté précédemment, des données *in vitro* suggère que Bax requiert la présence de cardiolipines pour s'oligomériser et former un pore (Kuwana *et al.,* 2002). Or les cardiolipines sont initialement localisées dans la MMI. Se pourrait-il alors que la machinerie de fusion/fission régule la perméabilisation de la MME induite par Bax en créant le milieu lipidique nécessaire aux points de contact avec DRP-1 ou Fis-1 ? Endophiline B1, un lipide-

transférase, interagirait avec Bax pourrait servir à redistribuer les lipides de la MMI au niveau des points de contact pour une activation efficace de Bax (et par extension de Bak) (Cuddeback *et al.,* 2001 ; Karbowski *et al.,* 2004). Dans ce cas, l'endophiline B1 pourrait servir de régulateur de la perméabilisation de la MME.

En conclusion, l'identification des différentes étapes conduisant à la formation d'un pore par Bax et l'élucidation de la topographie de Bax dans les membranes permettront de fournir de nouvelles cibles thérapeutiques par intervention pharmacologique soit pour augmenter l'apoptose dans les tumeurs, soit pour inhiber l'apoptose dans certaines maladies comme les ischémies.

BIBLIOGRAPHIE

A

- Abraham MC, and Shaham S (2004). Death without caspases, caspases without death. *Trends Cell Biol.,* **14**(4):184-93.
- Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, and Akey CW (2002). Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell,* **9**(2):423-32.
- Adams JM, and Cory S (2002). Apoptosomes: engines for caspase activation. *Curr Opin Cell Biol.,* **14**(6):715–20.
- Adams JM (2003). Ways of dying: Multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev.,* **17**(20):2481-95.
- Adrain C, Slee AE, Harte MT, and Martin SJ (1999). Regulation of apoptotic protease activating factor-1 oligomerization and apoptosis by the WD-40 repeat region. *J Biol Chem.,* **274**(30):20855-60.
- Ahmad M, Srinivasula SM, Wang L, Talanian RV, Litwack G, Fernandes-Alnemri T, and Alnemri ES (1997). CRADD, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase-2, and FasL/tumor necrosis factor receptor-interacting protein RIP. *Cancer Res.,* **57**(4):615-9.
- Ahting U, Thieffry M, Engelhardt H, Hegerl R, Neupert W, and Nussberger S (2001). Tom40, the Pore-forming Component of the Protein-conducting TOM Channel in the Outer Membrane of Mitochondria, *J. Cell Biol.,* **153**:1151-1160.
- Akao Y, Otsuki Y, Kataoka S, Ito Y, and Tsujimoto Y (1994). Multiple subcellular localization of bcl-2: detection in nuclear outer membrane, endoplasmic reticulum membrane, and mitochondrial membranes. *Cancer Res.,* **54**(9):2468-71.
- Allan LA, Morrice N, Brady S, Magee G, Pathak S, and Clarke PR (2003). Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK. *Nat Cell Biol.,* **5**(7):647-54.
- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, and Yuan J (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell,* **87**(2):171.
- Amarante-Mendes GP, and Green DR (1999). The regulation of apoptotic cell death. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **32**(9):1053-61.
- Ambrosini G, Adida C, and Altieri D (1997). A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med.,* **3**(8):917–21.
- Ameisen JC (2002). On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death Differ.,* **9**(4):367-93.
- Amundson SA, Myers TG, Scudiero D, Kitada S, Reed JC, and Fornace AJ Jr. (2000). An informatics approach identifying markers of chemosensitivity in human cancer cell lines. *Cancer Res.,* **60**(21):6101-10.
- Ankarcrona M, Dypbukt JM, Brune B, and Nicotera P (1994). Interleukin-1 beta-induced nitric oxide production activates apoptosis in pancreatic RINm5F cells. *Exp Cell Res.,* **213**(1):172-7.
- Annis MG, Zamzami N, Zhu W, Penn LZ, Kroemer G, Leber B, and Andrews DW (2001). Endoplasmic reticulum localized Bcl-2 prevents apoptosis when redistribution of cytochrome c is a late event. *Oncogene,* **20**(16):1939-52.
- Annis MG, Soucie EL, Dlugosz PJ, Cruz-Aguado JA, Penn LZ, Leber B, and Andrews DW (2005). Bax forms multispanning monomers that oligomerize to permeabilize membranes during apoptosis . *EMBO J.*, **24**(12):2096–103.

- Antonsson B, Conti F, Ciavatta A, Montessuit S, Lewis S, Martinou I, Bernasconi L, Bernard, A, Mermod JJ, Mazzei G, Maundrell K, Gambale F, Sadoul R, and Martinou JC (1997). Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science,* **277**(5324):370-2.
- Antonsson B, and Martinou JC (2000). The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res.,* **256**(1):50-7. Review.
- Antonsson B, Montessuit S, Lauper S, Eskes R, and Martinou JC (2000). Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J.,* **345**(Pt 2):271-8.
- Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B, and Martinou JC (2001). Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem*., **276**(15):11615-23. Epub 2001 Jan 2.
- Aouacheria A, Arnaud E, Venet S, Lalle P, Gouy M, Rigal D, and Gillet G (2001). Nrh, a human homologue of Nr-13 associates with Bcl-Xs and is an inhibitor of apoptosis. *Oncogene,* **20**(41):5846-55.
- Apte SS, Mattei MG, and Olsen BR (1995). Mapping of the human BAX gene to chromosome 19q13.3-q13.4 and isolation of a novel alternatively spliced transcript, BAX delta. *Genomics,* **26**(3):592-4.
- Arnoult D, Parone P, Martinou JC, Antonsson B, Estaquier J, and Ameisen JC (2002). Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor occurs downstream of cytochrome c release in response to several proapoptotic stimuli. *J Cell Biol.,* **159**(6):923-9. Epub 2002 Dec 16.
- Arnoult D, Gaume B, Karbowski M, Sharpe JC, Cecconi F, and Youle RJ (2003). Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *EMBO J.,* **22**(17):4385-99.
- Arnoult D, Bartle LM, Skaletskaya A, Poncet D, Zamzami N, Park PU, Sharpe J, Youle RJ, and Goldmacher VS (2004). Cytomegalovirus cell death suppressor vMIA blocks Bax- but not Bak-mediated apoptosis by binding and sequestering Bax at mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.,* **101**(21):7988-93. Epub 2004 May 17.
- Arokium H, Camougrand N, Vallette FM, and Manon S (2004). Studies of the interaction of substituted mutants of BAX with yeast mitochondria reveal that the C-terminal hydrophobic alpha-helix is a second ART sequence and plays a role in the interaction with anti-apoptotic BCL-xL. *J Biol Chem.,* **279**(50):52566-73. Epub 2004 Sep 30.
- Ashe PC, and Berry MD (2003). Apoptotic signaling cascades. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.,* **27**(2):199-214.
- Assefa Z, Vantieghem A, Garmyn M, Declercq W, Vandenabeele P, Vandenheede JR, Bouillon R, Merlevede W, and Agostinis P (2000). p38 mitogen-activated protein kinase regulates a novel, caspase-independent pathway for the mitochondrial cytochrome c release in ultraviolet B radiation-induced apoptosis. *J Biol Chem.,* **275**(28):21416-21.

B

- Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, Brunskill EW, Sayen MR, Gottlieb RA, Dorn GW, Robbins J, and Molkentin JD (2005). Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature,* **434**(7033):658-62.
- Bairey O, Zimra Y, Shaklai M, Okon E, and Rabizadeh E (1999). Bcl-2, Bcl-X, Bax, and Bak expression in short- and long-lived patients with diffuse large B-cell lymphomas. *Clin Cancer Res.,* **5**(10):2860-6.

- Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P, Wright JJ, McBride OW, Epstein AL, and Korsmeyer SJ (1985). Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell,* **41**(3):899-906.
- Barnoy S, and Kosower NS (2003). Caspase-1-induced calpastatin degradation in myoblast differentiation and fusion: cross-talk between the caspase and calpain systems. *FEBS Lett.,* **546**(2-3):213-7.
- Basanez G, Zhang J, Chau BN, Maksaev GI, Frolov VA, Brandt TA, Burch J, Hardwick JM, and Zimmerberg J (2001). Pro-apoptotic cleavage products of Bcl-xL form cytochrome c-conducting pores in pure lipid membranes. *J Biol Chem.,* **276**(33):31083-91. Epub 2001 Jun 8.
- Basu A, Johnson DE, and Woolard MD (2002). Potentiation of tumor necrosis factor-alpha-induced cell death by rottlerin through a cytochrome-C-independent pathway. *Exp Cell Res.,* **278**(2):209-14.
- Bellot G, Cartron PF, Oliver L, Juin P, Armstrong LC, Bornstein P, Mihara K, Manon S, and Vallette FM (2006). TOM 22, a core component of the mitochondria outer membrane protein translocation pore, is a mitochondrial receptor for the pro-apoptotic protein BAX. *Cell Death Diff.* (in revision).
- Bennett MJ, Choe S, and Eisenberg D (1994a). Refined structure of dimeric diphtheria toxin at 2.0 A resolution. *Protein Sci.,* **3**(9):1444-63.
- Bennett MJ, Choe S, and Eisenberg D (1994b). Domain swapping: entangling alliances between proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.,* **91**(8):3127-31.
- Bennett MJ, and Eisenberg D (1994). Refined structure of monomeric diphtheria toxin at 2.3 A resolution. *Protein Sci.,* **3**(9):1464-75.
- Bennett MJ, Schlunegger MP, and Eisenberg D (1995). 3D domain swapping: a mechanism for oligomer assembly. *Protein Sci.,* **4**(12):2455-68. Review.
- Bergeron L, Perez GI, Macdonald G, Shi L, Sun Y, Jurisicova A, Varmuza S, Latham KE, Flaws JA, Salter JC, Hara H, Moskowitz MA, Li E, Greenberg A, Tilly JL, and Yuan J (1998). Defects in regulation of apoptosis in caspase-2-deficient mice. *Genes Dev.,* **12**(9):1304-14.
- Bertin J, Armstrong RC, Ottilie S, Martin DA, Wang Y, Banks S, Wang GH, Senkevich TG, Alnemri ES, Moss B, Lenardo MJ, Tomaselli KJ, and Cohen JI (1997). Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNFR1-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **94**(4):1172-6.
- Bicknell GR, and Cohen GM (1995). Cleavage of DNA to large kilobase pair fragments occurs in some forms of necrosis as well as apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.,* **207**(1):40-7.
- Birnbaum MJ, Clem RJ, and Miller LK (1994). An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *J Virol.,* **68**(4):2521-8.
- Black S, Kadyrov M, Kaufmann P, Ugele B, Emans N, and Huppertz B (2004). Syncytial fusion of human trophoblast depends on caspase 8. *Cell Death Differ.,* **11**(1):90-8.
- Blagosklonny MV, Giannakakou P, el-Deiry WS, Kingston DG, Higgs PI, Neckers L, and Fojo T (1997). Raf-1/bcl-2 phosphorylation: a step from microtubule damage to cell death. *Cancer Res.,* **57**(1):130-5.
- Blanchard H, Kodandapani L, Mittl PR, Marco SD, Krebs JF, Wu JC, Tomaselli KJ, and Grutter MG (1999). The three-dimensional structure of caspase-8: an initiator enzyme in apoptosis. *Structure Fold Des.,* **7**(9):1125-33.

- Boatright KM, Renatus M, Scott FL, Sperandio S, Shin H, Pedersen IM, Ricci JE, Edris WA, Sutherlin DP, Green DR, and Salvesen GS (2003). A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell.,* **11**(2):529-41.
- Boatright KM, and Salvesen GS (2003). Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol.,* **15**(6):725-31. Review.
- Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, June CH, Accavitti MA, Lindsten T, and Thompson CB (1995). CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity,* **3**(1):87-98.
- Boise LH, and Thompson CB (1997). Bcl-x(L) can inhibit apoptosis in cells that have undergone Fas-induced protease activation. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **94**(8):3759-64.
- Boldin MP, Varfolomeev EE, Pancer Z, Mett IL, Camonis JH, and Wallach D (1995). A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem.,* **270**(14):7795-8.
- Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, and Wallach D (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell,* **85**(6):803-15.
- Borner C, Martinou I, Mattmann C, Irmler M, Schaerer E, Martinou JC, and Tschopp J (1994a). The protein bcl-2 alpha does not require membrane attachment, but two conserved domains to suppress apoptosis. *J Cell Biol.*, **126**(4):1059-68.
- Borner C, Olivier R, Martinou I, Mattmann C, Tschopp J, and Martinou JC (1994b). Dissection of functional domains in Bcl-2 alpha by site-directed mutagenesis. *Biochem Cell Biol.,* **72**(11-12):463-9.
- Borner C (2003). Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol.* **39**(11):615-647.
- Bouillet P, Metcalf D, Huang DC, Tarlinton DM, Kay TW, Kontgen F, Adams JM, and Strasser A (1999). Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science,* **286**(5445):1735-1738.
- Bouillet P, and Strasser A (2002). BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Sci.,* **115**(Pt 8):1567-74.
- Boyd JM, Gallo GJ, Elangovan B, Houghton AB, Malstrom S, Avery BJ, Ebb RG, Subramanian T, Chittenden T, Lutz RJ, and *et al.* (1995). Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins. *Oncogene,* **11**(9):1921-8.
- Breitschopf K, Haendeler J, Malchow P, Zeiher AM, and Dimmeler S (2000). Posttranslational modification of Bcl-2 facilitates its proteasome-dependent degradation: molecular characterization of the involved signaling pathway. .*Mol Cell Biol.,* **20**(5):1886-96.
- Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnan L, Susin SA, Diaz-Latoud C, Gurbuxani S, Arrigo AP, Kroemer G, Solary E, and Garrido C (2000). Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol.,* **2**(9):645-52.
- Buchholz TA, Davis DW, McConkey DJ, Symmans WF, Valero V, Jhingran A, Tucker SL, Pusztai L, Cristofanilli M, Esteva FJ, Hortobagyi GN, and Sahin AA (2003). Chemotherapy-induced apoptosis and Bcl-2 levels correlate with breast cancer response to chemotherapy. *Cancer J.,* **9**(1):33-41.
- Bump NJ, Hackett M, Hugunin M, Seshagiri S, Brady K, Chen P, Ferenz C, Franklin S, Ghayur T, Li P, and *et al.* (1995). Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science,* **269**(5232):1885-8.
- Burlacu A (2003). Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J Cell Mol Med.,* **7**(3):249-57. Review.

C

- Cain K, Brown DG, Langlais C, and Cohen GM (1999). Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex. *J Biol Chem.,* **274**(32):22686-92.
- Camerini D, Walz G, Loenen WA, Borst J, and Seed B (1991). The T cell activation antigen CD27 is a member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor gene family. *J Immunol.* **147**(9):3165-9.
- Campone M, Vavasseur F, Le Cabellec MT, Meflah K, Vallette FM, Oliver L (2001). Induction of chemoresistance in HL-60 cells concomitantly causes a resistance to apoptosis and the synthesis of P-glycoprotein. *Leukemia,* **15**(9):1377–87.
- Candé C, Cohen I, Daugas E, Ravagnan L, Larochette N, Zamzami N, and Kroemer G (2002). Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie,* **84**(2-3):215-22.
- Cao X, Deng X, and May WS (2003). Cleavage of Bax to p18 Bax accelerates stress-induced apoptosis, and a cathepsin-like protease may rapidly degrade p18 Bax. *Blood,* **102**(7):2605-14. Epub 2003 Jun 19.
- Capano M, and Crompton M (2002). Biphasic translocation of Bax to mitochondria. *Biochem J.,* **367**(Pt 1):169-78.
- Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, and Reed JC (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science,* **282** (5392):1318-21.
- Carlile GW, Smith DH, and Wiedmann M (2004). Caspase-3 has a nonapoptotic function in erythroid maturation. Blood, **103**(11):4310-6. Epub 2004 Feb 19.
- Carmody RJ, and Cotter TG (2000). Oxidative stress induces caspase-independent retinal apoptosis in vitro. *Cell Death Differ.,* **7**(3):282-91.
- Carrington PE, Sandu C, Wei Y, Hill JM, Morisawa G, Huang T, Gavathiotis E, Wei Y, and Werner MH (2006). The structure of FADD and its Mode of Interaction with Procaspase-8. *Mol Cell,* **22**(5): 599-610.
- Cartron PF, Moreau C, Oliver L, Mayat E, Meflah K, and Vallette FM (2002a). Involvement of the N-terminus of Bax in its intracellular localization and function. *FEBS Lett.,* **512**(1-3):95-100.
- Cartron PF, Oliver L, Martin S, Moreau C, LeCabellec MT, Jezequel P, Meflah K, and Vallette FM (2002b). The expression of a new variant of the pro-apoptotic molecule Bax, Baxpsi, is correlated with an increased survival of glioblastoma multiforme patients. *Hum Mol Genet.,* **11**(6):675-87.
- Cartron PF, Juin P, Oliver L, Martin S, Meflah K, and Vallette FM (2003a). Nonredundant Role of Bax and Bak in Bid-Mediated Apoptosis. *Mol Cell Biol.,* **23**(13):4701-12.
- Cartron PF, Priault M, Oliver L, Meflah K, Manon S, and Vallette FM (2003b). The N-terminal end of Bax contains a mitochondrial-targeting signal. *J Biol Chem.,* **278**(13):11633-41.
- Cartron PF, Gallenne T, Bougras G, Gautier F, Manero F, Vusio P, Meflah K, Vallette FM, and Juin P (2004a). 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**(5):807-18.
- Cartron PF, Oliver L, Juin P, Meflah K, and Vallette FM (2004b). The p18 truncated form of Bax behaves like a Bcl-2 homology domain 3-only protein. *J Biol Chem.* **279**(12):11503-12.

- Cartron PF, Arokium H, Oliver L, Meflah K, Manon S, and Vallette FM (2005). Distinct domains control the addressing and the insertion of Bax into mitochondria. *J Biol Chem.,* **280**(11):10587-98. Epub 2004 Dec 7.
- Castedo M, Perfettini JL, and Kroemer G (2002). Mitochondrial apoptosis and the peripheral benzodiazepine receptor: a novel target for viral and pharmacological manipulation. *J Exp Med.,* **196**(9):1121-5. Review.
- Cecconi F, Alvarez-Bolado G, Meyer BI, Roth KA, and Gruss P (1998). Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development. *Cell,* **94**(6):727-37.
- Chai J, Du C, Wu JW, Kyin S, Wang X, and Shi Y (2000). Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature,* **406**(6798):855-62.
- Chai J, Shiozaki E, Srinivasula SM, Wu Q, Datta P, Alnemri ES, and Shi Y (2001). Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell,* **104**(5):769-80.
- Chan SL, Lee MC, Tan KO, Yang LK, Lee AS, Flotow H, Fu NY, Butler MS, Soejarto DD, Buss AD, and Yu VC (2003). Identification of chelerythrine as an inhibitor of BclXL function. *J Biol Chem.,* **278**(23):20453-6.
- Chang BS, Minn AJ, Muchmore SW, Fesik SW, and Thompson CB (1997). Identification of a novel regulatory domain in Bcl-X(L) and Bcl-2. *Embo J.,* **16**(5):968-77.
- Chang DW, Xing Z, Capacio VL, Peter ME, and Yang X (2003). Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation. *EMBO J.,* **22**(16):4132-42.
- Chaudhary PM, Eby M, Jasmin A, Bookwalter A, Murray J, and Hood L (1997). Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. *Immunity,* **7**(6):821-30.
- Chen G, Ray R, Dubik D, Shi L, Cizeau J, Bleackley RC, Saxena S, Gietz RD, and Greenberg AH (1997). The E1B 19K/Bcl-2-binding protein Nip3 is a dimeric mitochondrial protein that activates apoptosis. *J Exp Med.* **186**(12):1975-83.
- Chen G, Cizeau J, Vande Velde C, *et al.* (1999). Nix and Nip3 form a subfamily of pro-apoptotic mitochondrial proteins. *J Biol Chem.,* **274**(1):7-10
- Chen G, and Goeddel DV (2002). TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science,* **296**(5573):1634-5. Review.
- Chen J, Nagayama T, Jin K, Stetler RA, Zhu RL, Graham SH, and Simon RP (1998). Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J Neurosci.,* **18**(13):4914-28.
- Chen J, Freeman A, Liu J, Dai Q, and Lee RM (2002). The apoptotic effect of HA14-1, a Bcl-2-interacting small molecular compound, requires Bax translocation and is enhanced by PK11195. *Mol Cancer Ther.,* **1**(12):961-7.
- Chen M, He H, Zhan S, Krajewski S, Reed JC, and Gottlieb RA (2001). Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion. *J Biol Chem.,* **276**(33):30724-8. Epub 2001 Jun 12.
- Chen Z, Naito M, Hori S, Mashima T, Yamori T, and Tsuruo T (1999). A human IAP-family gene, apollon, expressed in human brain cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.,* **264**(3):847-54.
- Cheng EH, Levine B, Boise LH, Thompson CB, and Hardwick JM (1996). Bax-independent inhibition of apoptosis by Bcl-XL. *Nature,* **379**(6565):554-6.
- Cheng EH, Kirsch DG, Clem RJ, Ravi R, Kastan MB, Bedi A, Ueno K, and Hardwick JM (1997a). Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science,* **278**(5345):1966-8.
- Cheng EH, Nicholas J, Bellows DS, Hayward GS, Guo HG, Reitz MS and Hardwick JM (1997b). A bcl-2 homolog encoded by Kaposi sarcoma-associated virus, human herpesvirus 8,

inhibits apoptosis but does not heterodimerize with bax or bak. *Proc Natl Acad Sci U S A.,* **94**(2):690-4.

- Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, and Korsmeyer SJ (2001). BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell.,* **8**(3):705-711.
- Cheng EH, Sheiko TV, Fisher JK, Craigen WJ, and Korsmeyer SJ (2003). VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science,* **301**(5632):513-7.
- Chi KC, Wallis AE, Lee CH, De Menezes DL, Sartor J, Dragowska WH, and Mayer LD (2000). Effects of Bcl-2 modulation with G3139 antisense oligonucleotide on human breast cancer cells are independent of inherent Bcl-2 protein expression. *Breast Cancer Res Treat.,* **63**(3):199-212.
- Chi KN, Gleave ME, Klasa R, Murray N, Bryce C, Lopes de Menezes DE, D'Aloisio S, and Tolcher AW (2001). A phase I dose-finding study of combined treatment with antisense Bcl-2 oligonucleotide (Genasense) and mitoxantrone in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Clin Cancer Res.,* **7**(12):3920-7.
- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, and Dixit VM (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell,* **81**(4):505-12.
- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Yu GL, Lyons RH, Garg M, Duan DR, Xing L, Gentz R, Ni J, and Dixit VM (1996a). Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science,* **274** (5289):990-2.
- Chinnaiyan AM, Tepper CG, Seldin MF, O'Rourke K, Kischkel FC, Hellbardt S, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM (1996b). FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem.,* **271**(9):4961-5.
- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Lane BR, and Dixit VM (1997). Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death. *Science,* **275** (5303):1122-6.
- Chittenden T, Flemington C, Houghton AB, Ebb RG, Gallo GJ, Elangovan B, Chinnadurai G, Lutz RJ (1995a). A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *EMBO J.,* **14**(22):5589-96.
- Chittenden T, Harrington EA, O'Connor R, Flemington C, Lutz RJ, Evan GI, and Guild BC (1995b). Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature,* **374**(6524):733-6.
- Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, and Green DR (2006). Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death Differ.,* **13**(8):1396-402. Epub 2006 May 19. Review.
- Choi SS, Park IC, Yun JW, Sung YC, Hong SI, and Shin HS (1995). A novel Bcl-2 related gene, Bfl-1, is overexpressed in stomach cancer and preferentially expressed in bone marrow. *Oncogene,* **11**(9):1693-8.
- Chou JJ, Li H, Salvesen GS, Yuan J, and Wagner G (1999). Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signaling. *Cell,* **96**(5):615-24.
- Chung CT, Niemela SL, and Miller RH (1989). One-Step Preparation of Competent Escherichia coli: Transformation and Storage of Bacterial Cells in the Same Solution. *Proc Natl Acad Sci U S A.,* **86**(7):2172-5.
- Cikala M, Wilm B, Hobmayer E, Bottger A and David CN (1999). Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan Hydra. *Curr Biol.,* **9**(17): 959-62.
- Cilenti L, Lee Y, Hess S, Srinivasula S, Park KM, Junqueira D, Davis H, Bonventre JV, Alnemri ES, and Zervos AS (2003). Characterization of a novel and specific inhibitor for the pro-apoptotic protease Omi/HtrA2. *J Biol Chem.,* **278**(13):11489-94. Epub 2003 Jan 15.

- Cleary ML, Smith SD, and Sklar J (1986). Cloning and structural analysis of cDNA for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14:18) translocation. *Cell,* **47**(1):19-28.
- Clem RJ, Cheng EH, Karp CL, Kirsch DG, Ueno K, Takahashi A, Kastan MB, Griffin DE, Earnshaw WC, Veliuona MA, and Hardwick JM (1998). Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.,* **95**(2):554-9.
- Clem RJ, Sheu TT, Richter BW, He WW, Thornberry NA, Duckett CS, and Hardwick JM (2001). c-IAP1 is cleaved by caspases to produce a pro-apoptotic C-terminal fragment. *J Biol Chem.,* **276**(10):7602–8.
- Cohen GM (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.,* **326**(Pt1):1-16.
- Cohen JJ (1991). Programmed cell death in the immune system. *Adv Immunol.,* **50**: 55-85.
- Condon LT, Ashman JN, Ell SR, Stafford ND, Greenman J, and Cawkwell L (2002). Overexpression of Bcl-2 in squamous cell carcinoma of the larynx: a marker of radioresistance. *Int J Cancer.,* **100**(4):472-5.
- Conradt B, and Horvitz HR (1998). The C. elegans protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell,* **93**(4):519-29.
- Conus S, Kaufmann T, Fellay I, Otter I, Rosse T, and Borner C (2000). Bcl-2 is a monomeric protein: prevention of homodimerization by structural constraints. *Embo J.,* **19**(7):1534-44.
- Cory S, Huang DC, and Adams JM (2003). The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene,* **22**(53):8590-607.
- Cote J, and Ruiz-Carrillo A (1993). Primers for mitochondrial DNA replication generated by endonuclease G. *Science,* **261**(5122):765-9.
- Cregan SP, Fortin A, MacLaurin JG, Callaghan SM, Cecconi F, Yu SW, Dawson TM, Dawson VL, Park DS, Kroemer G, and Slack RS (2002). Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *J Cell Biol.,* **158**(3):507-17. Epub 2002 Jul 29.
- Crook NE, Clem RJ, and Miller LK (1993). An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol.,* **67**(4):2168-74.
- Cuddeback SM, Yamaguchi H, Komatsu K, Miyashita T, Yamada M, Wu C, Singh S, and Wang HG (2001). Molecular cloning and characterization of Bif-1. A novel Src homology 3 domain-containing protein that associates with Bax. *J Biol Chem.,* **276**(23):20559-65. Epub 2001 Mar 20.

D

- Danial NN, and Korsmeyer SJ (2004). Cell death: critical control points. *Cell,* **116**(2):205-19.
- Darnell JE Jr, Kerr IM, and Stark GR (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science,* **264**(5164):1415-21.
- Day CL, Chen L, Richardson SJ, Harrison PJ, Huang DC, Hinds MG (2005). Solution structure of prosurvival Mcl-1 and characterization of its binding by proapoptotic BH3-only ligands. *J Biol Chem.,* **280**(6):4738-44. Epub 2004 Nov 18.
- De Botton S, Sabri S, Daugas E, Zermati Y, Guidotti JE, Hermine O, Kroemer G, Vainchenker W, and Debili N (2002). Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. *Blood,* **100**(4):1310-7. Comment in: *Blood,* **100**(4):1111-2.

- Deckwerth TL, Elliott JL, Knudson CM, Johnson EM Jr, Snider WD, and Korsmeyer SJ (1996). BAX is required for neuronal death after trophic factor deprivation and during development. *Neuron,* **17**(3):401-11.
- De Giorgi F, Lartigue L, Bauer MK, Schubert A, Grimm S, Hanson GT, Remington SJ, Youle RJ, and Ichas F (2002). The permeability transition pore signals apoptosis by directing Bax translocation and multimerization. *FASEB J.,* **16**(6):607-9.
- Degterev A, Lugovskoy A, Cardone M, Mulley M, Wagner G, Mitchison T, and Yuan J (2001). Identification of small-molecule inhibitors of interaction between the BH3 domain and Bcl-xL. *Nat Cell Biol.,* **3**(2):173-82.
- Dejean LM, Martinez-Caballero S, Guo L, Hughes C, Teijido O, Ducret T, Ichas F, Korsmeyer SJ, Antonsson B, Jonas EA, and Kinnally KW (2005). Oligomeric Bax is a component of the putative cytochrome c release channel MAC, mitochondrial apoptosis-induced channel. *Mol Biol Cell.,* **16**(5):2424-32. Epub 2005 Mar 16.
- Del Bello B, Valentini MA, Zunino F, Comporti M, Maellaro E (2001). Cleavage of Bcl-2 in oxidant- and cisplatin-induced apoptosis of human melanoma cells. *Oncogene,* **20**(33):4591-5.
- De Maria R, Zeuner A, Eramo A, Domenichelli C, Bonci D, Grignani F, Srinivasula SM, Alnemri ES, Testa U, and Peschle C (1999). Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nature,* **401**(6752):489-93.
- Deng X, Ito T, Carr B, Mumby M, and May WS Jr (1998). Reversible phosphorylation of Bcl2 following interleukin 3 or bryostatin 1 is mediated by direct interaction with protein phosphatase 2A. *J Biol Chem.,* **273**(51):34157-63.
- Denisov AY, Madiraju MS, Chen G, Khadir A, Beauparlant P, Attardo G, Shore GC, and Gehring K (2003). Solution structure of human BCL-w: modulation of ligand binding by the C-terminal helix. *J Biol Chem.,* **278**(23):21124-8. Epub 2003 Mar 21.
- Derenne S, Monia B, Dean NM, Taylor JK, Rapp MJ, Harousseau JL, Bataille R, and Amiot M (2000). Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-x(L) is an essential survival protein of human myeloma cells. *Blood,* **100**(1):194-9.
- Desagher S, Osen-Sand A, Nichols A, Eskes R, Montessuit S, Lauper S, Maundrell K, Antonsson B, and Martinou JC (1999). Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol.,* **144**(5): 891-901.
- Desagher S, and Martinou JC (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.,* **10**(9):369-77. Review.
- De Smaele E, Zazzeroni F, Papa S, Nguyen DU, Jin R, Jones J, Cong R, and Franzoso G (2001). Induction of gadd45beta by NF-kappaB downregulates pro-apoptotic JNK signalling. *Nature,* **414**(6861):308-13.
- Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, and Reed JC (1997). X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature,* **388**(6639):300-4.
- Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM, Alnemri ES, Salvesen GS, and Reed JC (1998). IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *Embo J.,* **17**(8):2215-23.
- Deveraux QL, Stennicke HR, Salvesen GS, and Reed JC (1999). Endogenous inhibitors of caspases. *J Clin Immunol.* ,**19**(6):388–98.
- Deveraux QL, and Reed JC (1999). IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev.,* **13**(3):239-52.
- D'Herde K, De Prest B, Mussche S, Schotte P, Beyaert R, Coster RV, and Roels F (2000). Ultrastructural localization of cytochrome c in apoptosis demonstrates mitochondrial heterogeneity. *Cell Death Differ.,* **7**(4):331-7.

- Dijkers PF, Medema RH, Lammers JW, Koenderman L, and Coffer PJ (2000). Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr Biol.,* **10**(19):1201-4.
- Donepudi M, Mac Sweeney A, Briand C, and Grutter MG (2003). Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation. *Mol Cell,* **11**(2):543-9.
- Dong Z, Saikumar P, Weinberg JM, and Venkatachalam MA (1997). Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement of serine but not cysteine proteases. *Am J Pathol.,* **151**(5):1205-13.
- Dorai T, Perlman H, Walsh K, Shabsigh A, Goluboff ET, Olsson CA, and Buttyan R (1999). A recombinant defective adenoviral agent expressing anti-bcl-2 ribozyme promotes apoptosis of bcl-2-expressing human prostate cancer cells. *Int J Cancer.,* **82**(6):846-52.
- Droin N, Dubrez L, Eymin B, Renvoize C, Breard J, Dimanche-Boitrel MT, and Solary E (1998). Upregulation of CASP genes in human tumor cells undergoing etoposide-induced apoptosis. *Oncogene,* **16**(22):2885-94.
- Droin NM, and Green DR (2004). Role of Bcl-2 family members in immunity and disease. *Biochim Biophys Acta.,* **1644**(2-3):179-88. Review.
- Du C, Fang M, Li Y, Li L, and Wang X (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell,* **102**(1):33-42.
- Duan H, and Dixit VM (1997). RAIDD is a new 'death' adaptor molecule. *Nature,* **385**(6611):86-9.
- Duckett CS, Nava VE, Gedrich RW, Clem RJ, Van Dongen JL, Gilfillan MC, Shiels H, Hardwick JM, and Thompson CB (1996). A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *Embo J.,* **15**(11):2685-94.
- Duckett CS, Li F, Wang Y, Tomaselli KJ, Thompson CB, and Armstrong RC (1998). Human IAP-like protein regulates programmed cell death downstream of Bcl-xL and cytochrome c. *Mol Cell Biol.,* **18**(1):608-15.
- Duke RC, Ojcius DM, and Young JD (1996). Cell suicide in health and disease. *Sci Am.,* **275**(6):80-7.
- Durkop H, Latza U, Hummel M, Eitelbach F, Seed B, and Stein H (1992). Molecular cloning and expression of a new member of the nerve growth factor receptor family that is characteristic for Hodgkin's disease. *Cell,* **68**(3):421-7.
- Duval A, and Hamelin R (2002). Genetic instability in human mismatch repair deficient cancers. *Ann Genet.,* **45**(2):71-5.
- Duvall E, and Wyllie AH (1986). Death and the cell. *Immunol. Today,* **7**:115-19.

E

- Earnshaw WC, Martins LM, and Kaufmann SH (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem.,* **68**:383-424. Review.
- Eckhart L, Declercq W, Ban J, Rendl M, Lengauer B, Mayer C, Lippens S, Vandenabeele P, and Tschachler E (2000). Terminal differentiation of human keratinocytes and stratum corneum formation is associated with caspase-14 activation. *J Invest Dermatol.,* **115**(6):1148-51.
- Eguchi K (2001). Apoptosis in autoimmune diseases. *Intern Med.,* **40**(4):275-84. Review.
- Ekert PG, Silke J, and Vaux DL (1999). Inhibition of apoptosis and clonogenic survival of cells expressing crmA variants: optimal caspase substrates are not necessarily optimal inhibitors. *EMBO J.,* **18**(2):330-8.

- Elez R, Piiper A, Kronenberger B, Kock M, Brendel M, Hermann E, Pliquett U, Neumann E, and Zeuzem S (2003). Tumor regression by combination antisense therapy against Plk1 and Bcl-2. *Oncogene,* **22**(1):69-80.
- Eliseev R, Alexandrov A, and Gunter T (2004). High-yield expression and purification of p18 form of Bax as an MBP-fusion protein. *Protein Expr Purif.,* **35**(2):206-9.
- Ellis HM, and Horvitz HR (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell,* **44**(6):817-29.
- Enari M, Hug H, and Nagata S (1995). Involvement of an ICE-like protease in Fas-mediated apoptosis. *Nature,* **375**(6526):78-81.
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A and Nagata S (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature,* **391**(6662):43-50.
- Enyedy IJ, Ling Y, Nacro K, Tomita Y, Wu X, Cao Y, Guo R, Li B, Zhu X, Huang Y, Long YQ, Roller PP, Yang D, and Wang S (2001). Discovery of small-molecule inhibitors of Bcl-2 through structure-based computer screening. *J Med Chem.* **44**(25):4313-24.
- Epand RF, Martinou JC, Montessuit S, Epand RM, and Yip CM (2002). Direct evidence for membrane pore formation by the apoptotic protein Bax. *Biochem Biophys Res Commun.,* **298**(5):744-9.
- Epand RF, Martinou JC, Montessuit S, and Epand RM (2004). Fatty acids enhance membrane permeabilization by pro-apoptotic Bax. *Biochem J.,* **377**(Pt 2):509-16.
- Er E, Oliver L, Cartron PF, Juin P, Manon S, and Vallette FM (2006). Mitochondria as the target of the pro-apoptotic protein Bax. *Biochim Biophys Acta.* **1757** :1301-11. Epub 2006 May 27.
- Eskes R, Antonsson B, Osen-Sand A, Montessuit S, Richter C, Sadoul R, Mazzei G, Nichols A, and Martinou JC (1998). Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg2+ ions. *J Cell Biol.,* **143**(1):217-24.
- Eskes R, Desagher S, Antonsson B, and Martinou JC (2000). Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol.,* **20**(3):929-35.
- Evan GI, and Vousden KH (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature,* **411**(6835):342-8.

F

- Fadeel B, Ahlin A, Henter JI, Orrenius S, and Hampton MB (1998). Involvement of caspases in neutrophil apoptosis: regulation by reactive oxygen species. *Blood,* **92**(12):4808–18.
- Fadeel B, Gleiss B, Hogstrand K, Chandra J, Wiedmer T, Sims PJ, Henter JI, Orrenius S and Samali A (1999a). Phosphatidylserine exposure during apoptosis is a cell-type-specific event and does not correlate with plasma membrane phospholipid scramblase expression. *Biochem Biophys Res Commun*., **266**(2):504-11.
- Fadeel B, Hassan Z, Hellstrom-Lindberg E, Henter JI, Orrenius S, and Zhivotovsky B (1999b). Cleavage of Bcl-2 is an early event in chemotherapy-induced apoptosis of human myeloid leukemia cells. *Leukemia,* **13**(5):719-28.
- Fadeel B, Orrenius S and Zhivotovsky B (1999c). Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony? *Biochem Biophys Res Commun.,* **266**(3):699-717.
- Fadok VA, Savill JS, Haslett C, Bratton DL, Doherty DE, Campbell PA, and Henson PM (1992). Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the

phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J Immunol.,* **149**(12):4029-35

- Farrow SN, White JH, Martinou I, Raven T, Pun KT, Grinham CJ, Martinou JC, and Brown R (1995). Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K. *Nature,* **374**(6524):731-3. Erratum in: *Nature,* (1995) **375**(6530):431.
- Fernandes-Alnemri T, Armstrong RC, Krebs J, Srinivasula SM, Wang L, Bullrich F, Fritz LC, Trapani JA, Tomaselli KJ, Litwack G, and Alnemri ES (1996). In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.,* **93**(15):7464-9.
- Fernando P, Kelly JF, Balazsi K, Slack RS, and Megeney LA (2002). Caspase 3 activity is required for skeletal muscle differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A., **99**(17):11025-30. Epub 2002 Aug 12.
- Ferri KF, Jacotot E, Blanco J, Este JA, and Kroemer G (2000). Mitochondrial control of cell death induced by HIV-1-encoded proteins. *Ann N Y Acad Sci.,* **926**:149-64. Review.
- Finkelstein EI, Ruben J, Koot CW, Hristova M, van der Vliet A (2005). Regulation of constitutive neutrophil apoptosis by the alpha,beta-unsaturated aldehydes acrolein and 4-hydroxynonenal. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.,* **289**(6):L1019-28. Epub 2005 Jul 22.
- Finnegan NM, Curtin JF, Prevost G, Morgan B, and Cotter TG. (2001). Induction of apoptosis in prostate carcinoma cells by BH3 peptides which inhibit Bak/Bcl-2 interactions. *Br J Cancer,* **85**(1):115-21.
- Fiorucci S, Santucci L, Cirino G, Mencarelli A, Familiari L, Soldato PD, and Morelli A (2000). IL-1 beta converting enzyme is a target for nitric oxide-releasing aspirin: new insights in the antiinflammatory mechanism of nitric oxide-releasing nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J Immunol.,* **165**(9):5245-54.
- Fischer U, Janicke RU, and Schulze-Osthoff K (2003). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ.,* **10**(1):76-100. Review.
- Flanagan JG (1999). Life on the road. *Nature*, **401**(6755):747-8.
- Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES, Leitner WW, Robert EG, Catez F, Smith CL, and Youle RJ (2001). The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell.,* **1**(4):515-25.
- Frey TG, and Mannella CA (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci.,* **25**(7):319-24.
- Frohlich KU, and Madeo F (2000). Apoptosis in yeast--a monocellular organism exhibits altruistic behaviour. *FEBS Lett.,* **473**(1):6-9.
- Fujita N, Nagahashi A, Nagashima K, Rokudai S, and Tsuruo T (1998). Acceleration of apoptotic cell death after the cleavage of Bcl-XL protein by caspase-3-like proteases. *Oncogene,* **17**(10):1295-304.
- Fujita N, and Tsuruo T (1998). Involvement of Bcl-2 cleavage in the acceleration of VP-16-induced U937 cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.,* **246**(2):484-8.
- Fulda S, Kufer MU, Meyer E, van Valen F, Dockhorn-Dworniczak B, and Debatin KM (2001). Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer. *Oncogene,* **20**(41):5865-77.
- Fulda S, and Debatin KM (2002). IFNgamma sensitizes for apoptosis by upregulating caspase-8 expression through the Stat1 pathway. *Oncogene,* **21**(15):2295-308.
- Fulda S, Meyer E, and Debatin KM (2002). Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression. *Oncogene,* **21**(15):2283-94.
- Futami T, Miyagishi M, Seki M, and Taira K (2002). Induction of apoptosis in HeLa cells with siRNA expression vector targeted against bcl-2. *Nucleic Acids Res.,* **Suppl. 2002**;(2):251-2.

G

- Galea-Lauri J, Richardson AJ, Latchman DS, and Katz DR (1996). Increased heat shock protein 90 (hsp90) expression leads to increased apoptosis in the monoblastoid cell line U937 following induction with TNF-alpha and cycloheximide: a possible role in immunopathology. *J Immunol.,* **157**(9):4109-18.
- Gao G, and Dou QP (2000). N-terminal cleavage of bax by calpain generates a potent proapoptotic 18-kDa fragment that promotes bcl-2-independent cytochrome C release and apoptotic cell death. *J Cell Biochem.,* **80**(1):53-72.
- Garcia-Saez AJ, Mingarro I, Perez-Paya E, and Salgado J (2004). Membrane-insertion fragments of Bcl-xL, Bax, and Bid. *Biochemistry,* **43**(34):10930-43.
- Gardai SJ, Hildeman DA, Frankel SK, Whitlock BB, Frasch SC, Borregaard N, Marrack P, Bratton DL, and Henson PM (2004). Phosphorylation of Bax Ser184 by Akt regulates its activity and apoptosis in neutrophils. *J Biol Chem.,* **279**(20):21085-95. Epub 2004 Feb 6.
- Garrido C, Ottavi P, Fromentin A, Hammann A, Arrigo AP, Chauffert B, and Mehlen P (1997). HSP27 as a mediator of confluence-dependent resistance to cell death induced by anticancer drugs. *Cancer Res.,* **57**(13):2661-7.
- Garrido C, Bruey JM, Fromentin A, Hammann A, Arrigo AP, and Solary E (1999). HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9. *Faseb J.,* **13**(14):2061-70.
- Gautschi O, Tschopp S, Olie RA, Leech SH, Simoes-Wust AP, Ziegler A, Baumann B, Odermatt B, Hall J, Stahel RA, and Zangemeister-Wittke U (2001). Activity of a novel bcl-2/bcl-xL-bispecific antisense oligonucleotide against tumors of diverse histologic origins. *J Natl Cancer Inst.*, **93**(6):463-71.
- Gibson L, Holmgreen SP, Huang DC, Bernard O, Copeland NG, Jenkins NA, Sutherland GR, Baker E, Adams JM, and Cory S (1996). bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival. *Oncogene,* **13**(4):665-75.
- Gibson SA, Pellenz C, Hutchison RE, Davey FR, and Shillitoe EJ (2000). Induction of apoptosis in oral cancer cells by an anti-bcl-2 ribozyme delivered by an adenovirus vector. *Clin Cancer Res.,* **6**(1):213-22.
- Gilbert MS, Saad AH, Rupnow BA, and Knox SJ (1996). Association of BCL-2 with membrane hyperpolarization and radioresistance. *J Cell Physiol.,* **168**(1):114-22.
- Gillet G, Guerin M, Trembleau A, and Brun G (1995). A Bcl-2-related gene is activated in avian cells transformed by the Rous sarcoma virus. *EMBO J.,* **14**(7):1372-81.
- Goldstein JC, Waterhouse NJ, Juin P, Evan GI, and Green DR (2000). The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol.,* **2**(3):156-62. Comment in: *Nat Cell Biol.* (2000) **2**(3):E37 ; *Nat Cell Biol.* (2000) **2**(3):E41-3.
- Golstein P, Ojcius DM, and Young JD (1991). Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol Rev.,* **121**:29-65.
- Golstein P, Marguet D, and Depraetere V (1995). Homology between reaper and the cell death domains of Fas and TNFR1. *Cell,* **81**(2):185-6.
- Goltsev YV, Kovalenko AV, Arnold E, Varfolomeev EE, Brodianskii VM, and Wallach D (1997). CASH, a novel caspase homologue with death effector domains. *J Biol Chem.,* **272**(32):19641-4.
- Goping IS, Gross A, Lavoie JN, Nguyen M, Jemmerson R, Roth K, Korsmeyer SJ, and Shore GC (1998). Regulated targeting of BAX to mitochondria. *J Cell Biol.,* **143**(1):207-15.
- Goyal L, McCall K, Agapite J, Hartwieg E, and Steller H (2000). Induction of apoptosis by Drosophila reaper, hid and grim through inhibition of IAP function. *EMBO J.,* **19**(4):589-97.

- Grandgirard D, Studer E, Monney L, Belser T, Fellay I, Borner C, Michel MR (1998). Alphaviruses induce apoptosis in Bcl-2-overexpressing cells: evidence for a caspase-mediated, proteolytic inactivation of Bcl-2. *EMBO J.,* **17**(5):1268-78.
- Gray CW, Ward RV, Karran E, Turconi S, Rowles A, Viglienghi D, Southan C, Barton A, Fantom KG, West A, Savopoulos J, Hassan NJ, Clinkenbeard H, Hanning C, Amegadzie B, Davis JB, Dingwall C, Livi GP, and Creasy CL (2000). Characterization of human HtrA2, a novel serine protease involved in the mammalian cellular stress response. *Eur J Biochem.,* **267**(18):5699-710.
- Green D, and Kroemer G (1998)**.** The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria. *Trends Cell Biol.*, **8**(7):267-71.
- Gross A, Jockel J, Wei MC, and Korsmeyer SJ (1998). Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J.,* **17**(14):3878-85.
- Gross A, McDonnell JM, and Korsmeyer SJ (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.,* **13**(15):1899-911. Review.
- Grotzer MA, Eggert A, Zuzak TJ, Janss AJ, Marwaha S, Wiewrodt BR, Ikegaki N, Brodeur GM, and Phillips PC (2000). Resistance to TRAIL-induced apoptosis in primitive neuroectodermal brain tumor cells correlates with a loss of caspase-8 expression. *Oncogene,* **19**(40):4604-10.
- Grumont RJ, Rourke IJ, and Gerondakis S (1999). Rel-dependent induction of A1 transcription is required to protect B cells from antigen receptor ligation-induced apoptosis. *Genes Dev.,* **13**(4):400-11.
- Grzmil M, Thelen P, Hemmerlein B, Schweyer S, Voigt S, Mury D, and Burfeind P (2003). Bax inhibitor-1 is overexpressed in prostate cancer and its specific down-regulation by RNA interference leads to cell death in human prostate carcinoma cells. *Am J Pathol.,* **163**(2):543-52.
- Gu J, Kagawa S, Takakura M, Kyo S, Inoue M, Roth JA, and Fang B (2000). Tumor-specific transgene expression from the human telomerase reverse transcriptase promoter enables targeting of the therapeutic effects of the Bax gene to cancers. *Cancer Res.,* **60**(19):5359-64.
- Gu J, Zhang L, Huang X, Lin T, Yin M, Xu K, Ji L, Roth JA, and Fang B (2002). A novel single tetracycline-regulative adenoviral vector for tumor-specific Bax gene expression and cell killing in vitro and in vivo. *Oncogene,* **21**(31):4757-64.
- Guo Y, Srinivasula SM, Druilhe A, Fernandes-Alnemri T, and Alnemri ES (2002). Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. *J Biol Chem.,* **277**(16):13430-7.
- Guo L, Pietkiewicz D, Pavlov EV, Grigoriev SM, Kasianowicz JJ, Dejean LM, Korsmeyer SJ, Antonsson B, and Kinnally KW (2004). Effects of cytochrome c on the mitochondrial apoptosis-induced channel MAC. *Am J Physiol Cell Physiol.,* **286**(5):C1109-17. Epub 2003 Dec 24.
- Guihard G, Bellot G, Moreau C, Pradal G, Ferry N, Thomy R, Fichet P, Meflah K, and Vallette FM (2004). The mitochondrial apoptosis-induced channel (MAC) corresponds to a late apoptotic event. *J Biol Chem.,* **279**(45):46542-50. Epub 2004 Aug 24.
- Gupta S, Radha V, Furukawa Y, and Swarup G (2001). Direct transcriptional activation of human caspase-1 by tumor suppressor p53. *J Biol Chem.,* **276**(14):10585-8. Epub 2001 Feb 13.

H

- Hakem R, Hakem A, Duncan GS, Henderson JT, Woo M, Soengas MS, Elia A, de la Pompa JL, Kagi D, Khoo W, Potter J, Yoshida R, Kaufman SA, Lowe SW, Penninger JM, and Mak TW (1998). Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell,* **94**(3):339-52.
- Haldar S, Jena N, and Croce CM (1995). Inactivation of Bcl-2 by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.,* **92**(10):4507-11.
- Haldar S, Basu A, and Croce CM (1997). Bcl2 is the guardian of microtubule integrity. *Cancer Res.,* **57**(2):229-33.
- Han DK, Chaudhary PM, Wright ME, Friedman C, Trask BJ, Riedel RT, Baskin DG, Schwartz SM, and Hood L (1997). MRIT, a novel death-effector domain-containing protein, interacts with caspases and BclXL and initiates cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.,* **94**(2):11333-8.
- Han J, Sabbatini P, Perez D, Rao L, Modha D, and White E (1996a). The E1B 19K protein blocks apoptosis by interacting with and inhibiting the p53-inducible and death-promoting Bax protein. *Genes Dev.,* **10**(4):461-77.
- Han J, Sabbatini P, and White E (1996b). Induction of apoptosis by human Nbk/Bik, a BH3-containing protein that interacts with E1B 19K. *Mol Cell Biol.,* **16**(10):5857-64.
- Han J, Flemington C, Houghton AB, Gu Z, Zambetti GP, Lutz RJ, Zhu L, and Chittenden T (2001). Expression of bbc3, a pro-apoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals. *Proc Natl Acad Sci U S A.,* **98**(20):11318-23.
- Hanada M, Aime-Sempe C, Sato T, and Reed JC (1995). Structure-function analysis of Bcl-2 protein. Identification of conserved domains important for homodimerization with Bcl-2 and heterodimerization with Bax. *J Biol Chem.,* **270**(20):11962-9.
- Hanahan D (1985). In: DNA Cloning, Volume 1, D. Glover, ed., IRL Press, Ltd., London, 109.
- Hanahan D, and Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell,* **100**(1):57-70.
- Harrison DC, Medhurst AD, Bond BC, Campbell CA, Davis RP, and Philpott KL (2000). The use of quantitative RT-PCR to measure mRNA expression in a rat model of focal ischemia--caspase-3 as a case study. *Brain Res Mol Brain Res.,* **75**(1):143-9.
- Hauser HP, Bardroff M, Pyrowolakis G, Jentsch S (1998). A giant ubiquitin-conjugating enzyme related to IAP apoptosis inhibitors. *J Cell Biol.,* **141**(6):1415-22.
- Hawkins CJ, Wang SL, and Hay BA (2000). Monitoring activity of caspases and their regulators in yeast Saccharomyces cerevisiae. *Methods Enzymol.,* **322**:162-74.
- Hedgecock EM, Sulston JE, and Thomson JN (1983). Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science,* **220**(4603):1277-9.
- Hegde R, Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, and Alnemri ES (1998). Blk, a BH3-containing mouse protein that interacts with Bcl-2 and Bcl-xL, is a potent death agonist. *J Biol Chem.,* **273**(14):7783-6.
- Hegde R, Srinivasula SM, Zhang Z, Wassell R, Mukattash R, Cilenti L, DuBois G, Lazebnik Y, Zervos AS, Fernandes-Alnemri T, and Alnemri ES (2002). Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem.,* **277**(1):432-8.
- Heimlich G, McKinnon AD, Bernardo K, Brdiczka D, Reed JC, Kain R, Kronke M, and Jurgensmeier JM (2004). Bax-induced cytochrome c release from mitochondria depends on alpha-helices-5 and -6. *Biochem J.,* **378**(Pt 1):247-55.

- Henderson S, Huen D, Rowe M, Dawson C, Johnson G, and Rickinson A (1993). Epstein–Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homolog of bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.,* **90**(18):8479-83.
- Hengartner MO, and Horvitz HR (1994). Programmed cell death in Caenorhabditis elegans. *Curr Opin Genet Dev.,* **4**(4):581-6. Review.
- Hengartner MO (1997). Apoptosis. CED-4 is a stranger no more. *Nature,* **388**(6644):714-5. Comment on: *Nature,* **388**(6644):728-9.
- Hengartner MO (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, **407**(6805):770-6. Comment in: *Nature,* **407**(6805):685-7.
- Heuck AP, Hotze EM, Tweten RK, and Johnson AE (2000). Mechanism of membrane insertion of a multimeric beta-barrel protein: perfringolysin O creates a pore using ordered and coupled conformational changes. *Mol Cell.,* **6**(5):1233-42.
- Heusel JW, Wesselschmidt RL, Shresta S, Russell JH, and Ley TJ (1994). Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell,* **76**(6):977-87.
- Hinds MG, Lackmann M, Skea GL, Harrison PJ, Huang DC, and Day CL (2003). The structure of Bcl-w reveals a role for the C-terminal residues in modulating biological activity. *EMBO J.,* **22**(7):1497-507.
- Hirata H, Takahashi A, Kobayashi S, Yonehara S, Sawai H, Okazaki T, Yamamoto K, and Sasada M (1998). Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. *J Exp Med.,* **187**(4):587-600.
- Hirsch T, Dallaporta B, Zamzami N, Susin SA, Ravagnan L, Marzo I, Brenner C, and Kroemer G (1998). Proteasome activation occurs at an early, premitochondrial step of thymocyte apoptosis. *J Immunol.,* **161**(1):35-40.
- Hitoshi Y, Lorens J, Kitada SI, Fisher J, LaBarge M, Ring HZ, Francke U, Reed JC, Kinoshita S, and Nolan GP (1998). Toso, a cell surface, specific regulator of Fas-induced apoptosis in T cells. *Immunity,* **8**(4):461-71.
- Hoffman PR, Kench JA, Vondracek A, Kruk E, Daleke DL, Jordan M, Marrack P, Henson PM, and Fadok VA (2005). Interaction between phosphatidylserine and the phosphatidylserine receptor inhibits immune response in vivo. *J Immunology,* **174**(3):1393-404.
- Hofmann K, Bucher P, and Tschopp J (1997). The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem Sci.,* **22**(5):155-6.
- Hohlbaum AM, Moe S, and Marshak-Rothstein A (2000). Opposing effects of transmembrane and soluble Fas ligand expression on inflammation and tumor cell survival. *J Exp Med.,* **191**(7):1209-20.
- Howard AD, Kostura MJ, Thornberry N, Ding GJ, Limjuco G, Weidner J, Salley JP, Hogquist KA, Chaplin DD, Mumford RA, and *et al.* (1991). IL-1-converting enzyme requires aspartic acid residues for processing of the IL-1 beta precursor at two distinct sites and does not cleave 31-kDa IL-1 alpha. *J Immunol.,* **147**(9):2964-9.
- Hsu H, Xiong J, and Goeddel DV (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell,* **81**(4):495-504.
- Hsu H, Huang J, Shu HB, Baichwal V, and Goeddel DV (1996a). TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity,* **4**(4):387-96.
- Hsu H, Shu HB, Pan MG, and Goeddel DV (1996b). TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell,* **84**(2):299-308.

- Hsu SY, Kaipia A, McGee E, Lomeli M, and Hsueh AJ (1997). Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proc Natl Acad Sci U S A.,* **94**(23):12401-6.
- Hsu SY, Lin P, and Hsueh AJ (1998). BOD (Bcl-2-related ovarian death gene) is an ovarian BH3 domain-containing proapoptotic Bcl-2 protein capable of dimerization with diverse antiapoptotic Bcl-2 members. *Mol Endocrinol.,* **12**(9):1432-40.
- Hsu YT, Wolter KG, and Youle RJ (1997). Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.,* **94**(8):3668-72.
- Hsu YT, and Youle RJ (1997). Nonionic detergents induce dimerization among members of the Bcl-2 family. *J Biol Chem.,* **272**(21):13829-34.
- Hsu YT, and Youle RJ (1998). Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. *J Biol Chem.,* **273**(17):10777-83.
- Hu S, Vincenz C, Ni J, Gentz R, and Dixit VM (1997). I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis. *J Biol Chem.,* **272**(28):17255-7.
- Hu S, and Yang X (2003). Cellular inhibitor of apoptosis 1 and 2 are ubiquitin ligases for the apoptosis inducer Smac/DIABLO. *J Biol Chem.,* **278**(12):10055-60. Epub 2003 Jan 13.
- Hu Y, Benedict MA, Wu D, Inohara N, and Nunez G (1998a). Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.,* **95**(8):4386-91.
- Huang DC, Adams JM, and 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**(4):1029-39.
- Huang H, Joazeiro CA, Bonfoco E, Kamada S, Leverson JD, and Hunter T (2000). The inhibitor of apoptosis, cIAP2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes in vitro monoubiquitination of caspase 3 and 7. *J Biol Chem.,* **275**(35):26661-4.
- Huang Q, Petros AM, Virgin HW, Fesik SW, and Olejniczak ET (2002). Solution structure of a Bcl-2 homolog from Kaposi sarcoma virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.,* **99**(6):3428-33.
- Huang Y, Park YC, Rich RL, Segal D, Myszka DG and Wu H (2001a). Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell,* **104**(5):781-90.
- Huang Y, Shin NH, Sun Y, and Wang KK (2001b). Molecular cloning and characterization of a novel caspase-3 variant that attenuates apoptosis induced by proteasome inhibition. *Biochem Biophys Res Commun.,* **283**(4):762-9.
- Hunter JJ, and Parslow TG (1996). A peptide sequence from Bax that converts Bcl-2 into an activator of apoptosis. J Biol Chem., 271(15):8521-4.
- Huot J, Roy G, Lambert H, Chretien P, and Landry J (1991). Increased survival after treatments with anticancer agents of Chinese hamster cells expressing the human Mr 27,000 heat shock protein. *Cancer Res.,* **51**(19):5245-52.

I

- Imai Y, Kimura T, Murakami A, Yajima N, Sakamaki K, and Yonehara S (1999). The CED-4-homologous protein FLASH is involved in Fas-mediated activation of caspase-8 during apoptosis. *Nature,* **398**(6730):777-85. Erratum in: *Nature,* **400**(6739):89. Comment in: Nature, **398**(6730):756-7 ; *Nature,* **401**(6754):662; discussion 662-3.
- Imaizumi K, Tsuda M, Imai Y, Wanaka A, Takagi T, and Tohyama M (1997). Molecular cloning of a novel polypeptide, DP5, induced during programmed neuronal death. *J Biol Chem.,* **272**(30):18842-8.

- Imaizumi K, Morihara T, Mori Y, Katayama T, Tsuda M, Furuyama T, Wanaka A, Takeda M, and Tohyama M (1999). The cell death-promoting gene DP5, which interacts with the BCL2 family, is induced during neuronal apoptosis following exposure to amyloid beta protein. *J Biol Chem.,* **274**(12):7975-81.
- Imazu T, Shimizu S, Tagami S, Matsushima M, Nakamura Y, Miki T, Okuyama A, and Tsujimoto Y (1999). Bcl-2/E1B 19 kDa-interacting protein 3-like protein (Bnip3L) interacts with bcl-2/Bcl-xL and induces apoptosis by altering mitochondrial membrane permeability. *Oncogene,* **18**(32):4523-9.
- Ink B, Zornig M, Baum B, Hajibagheri N, James C, Chittenden T, and Evan G (1997). Human Bak induces cell death in *Schizosaccharomyces pombe* with morphological changes similar to those with apoptosis in mammalian cells. *Mol Cell Biol.,* **17**(5): 2468-74.
- Inohara N, Ding L, Chen S, and Nunez G (1997a). harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L). *Embo J.,* **16**(7):1686-94.
- Inohara N, Koseki T, Hu Y, Chen S, and Nunez G (1997b). CLARP, a death effector domain-containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA.,* **94**(20):10717-22.
- Inohara N, Ekhterae D, Garcia I, Carrio R, Merino J, Merry A, Chen S, and Nunez G (1998a). Mtd, a novel Bcl-2 family member activates apoptosis in the absence of heterodimerization with Bcl-2 and Bcl-XL. *J Biol Chem.,* **273**(15):8705-10.
- Inohara N, Gourley TS, Carrio R, Muniz M, Merino J, Garcia I, Koseki T, Hu Y, Chen S, and Nunez G (1998b). Diva, a Bcl-2 homologue that binds directly to Apaf-1 and induces BH3-independent cell death. *J Biol Chem.,* **273**(49):32479-86.
- Ionov Y, Yamamoto H, Krajewski S, Reed JC, and Perucho M (2000). Mutational inactivation of the proapoptotic gene BAX confers selective advantage during tumor clonal evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.,* **97**(20):10872-7.
- Irmler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, and Tschopp J (1997b). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature,* **388**(6638):190-5. Comment in: *Nature,* **388**(6638):123, 125-6.
- Ishizaki Y, Jacobson MD, and Raff MC (1998). A role for caspases in lens fiber differentiation. *J Cell Biol.,* **140**(1):153-8.
- Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, Hase A, Seto Y, and Nagata S (1991). The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell,* **66**(2):233-43.
- Iverson SL, Enoksson M, Gogvadze V, Ott M, and Orrenius S (2004). Cardiolipin is not required for Bax-mediated cytochrome c release from yeast mitochondria. *J Biol Chem.,* **279**(2):1100-7. Epub 2003 Oct 8.

J

- Jabbour AM, Puryer MA, Yu JY, Lithgow T, Riffkin CD, Ashley DM, Vaux DL, Ekert PG, and Hawkins CJ (2006). Human Bcl-2 cannot directly inhibit the *Caenorhabditis elegans* Apaf-1 homologue CED-4, but can interact with EGL-1. *J Cell Sci.,* **119**(Pt 12):2572-82. Epub 2006 May 30.
- Jansen B, and Zangemeister-Wittke U (2002). Antisense therapy for cancer--the time of truth. *Lancet Oncol.,* **3**(11):672-83. Review. Erratum in: *Lancet Oncol.,* **4**(2):74.

- Jeong SY, Gaume B, Lee YJ, Hsu YT, Ryu SW, Yoon SH, and Youle RJ (2004). Bcl-x(L) sequesters its C-terminal membrane anchor in soluble, cytosolic homodimers. *EMBO J.,* **23**(10):2146-55. Epub 2004 May 6.
- Jiang X, and Wang X (2000). Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J Biol Chem.,* **275**(40):31199-203.
- Jiang Z, Zheng X, and Rich KM (2003). Down-regulation of Bcl-2 and Bcl-xL expression with bispecific antisense treatment in glioblastoma cell lines induce cell death. *J Neurochem.,* **84**(2):273-81.
- Jin KL, Graham SH, Mao XO, He X, Nagayama T, Simon RP, and Greenberg DA (2001). Bax kappa, a novel Bax splice variant from ischemic rat brain lacking an ART domain, promotes neuronal cell death. *J Neurochem.,* **77**(6):1508-19.
- Joazeiro CA, and Weissman AM (2000). RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell,* **102**(5):549-52.
- John GB, Anjum R, Khar A, and Nagaraj R (2002). Subcellular localization and physiological consequences of introducing a mitochondrial matrix targeting signal sequence in bax and its mutants. *Exp Cell Res.,* **278**(2):198-208.
- Johnson D, Lanahan A, Buck CR, Sehgal A, Morgan C, Mercer E, Bothwell M, and Chao M (1986). Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell,* **47**(4):545-54.
- Johnstone RW, Ruefli AA, and Lowe SW (2002). Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*, **108**(2):153-64.
- Juin P, Hunt A, Littlewood T, Griffiths B, Swigart LB, Korsmeyer S, and Evan G (2002). c-Myc functionally cooperates with Bax to induce apoptosis. *Mol Cell Biol.,* **22**(17):6158-69.
- Juin P, Geneste O, Raimbaud E, and Hickman JA (2004). Shooting at survivors: Bcl-2 family members as drug targets for cancer. *Biochim Biophys Acta.*, **1644**(2-3):251-60. Review.
- Jurgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, and Reed JC (1998). Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA.,* **95**(9):4997-5002.

K

- Kagawa S, Pearson SA, Ji L, Xu K, McDonnell TJ, Swisher SG, Roth JA, and Fang B (2000). A binary adenoviral vector system for expressing high levels of the proapoptotic gene bax. *Gene Ther.,* **7**(1):75-9.
- Kamada S, Shimono A, Shinto Y, Tsujimura T, Takahashi T, Noda T, Kitamura Y, Kondoh H, and Tsujimoto Y (1995). bcl-2 deficiency in mice leads to pleiotropic abnormalities: accelerated lymphoid cell death in thymus and spleen, polycystic kidney, hair hypopigmentation, and distorted small intestine. *Cancer Res.,* **55**(2):354-9.
- Kamesaki S, Kamesaki H, Jorgensen TJ, Tanizawa A, Pommier Y, and Cossman J (1993). bcl-2 protein inhibits etoposide-induced apoptosis through its effects on events subsequent to topoisomerase II-induced DNA strand breaks and their repair. *Cancer Res.,* **53**(18):4251-6. Erratum in: Cancer Res., (1994) **54**(11):3074.
- Kaplan JC, et Delpech M (1992). Biologie moléculaire et Médecine. De la biologie à la médecine. Paris : *Médecines Sciences, Flammarion, 2ème Edition*. 610 p.
- Karbowski M, Lee YJ, Gaume B, Jeong SY, Frank S, Nechushtan A, Santel A, Fuller M, Smith CL, and Youle RJ (2002). Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. *J Cell Biol.,* **159**(6):931-8. Epub 2002 Dec 23.
- Karbowski M, Jeong SY, and Youle RJ (2004). Endophilin B1 is required for the maintenance of mitochondrial morphology. *J Cell Biol.,* **166**(7):1027-39.

- Kariya S, Ogawa Y, Yoshida S, Yabuki M, Imajo Y, and Utsumi K (1999). X-irradiation enhances the expression of Bcl-2 in HL-60 cells: the resulting effects on apoptosis and radiosensitivity. *Int J Mol Med.,* **3**(2):145-52.
- Kashkar H, Kronke M, and Jurgensmeier JM (2002). Defective Bax activation in Hodgkin B-cell lines confers resistance to staurosporine-induced apoptosis. *Cell Death Differ.,* **9**(7):750-7.
- Kasibhatla S, Brunner T, Genestier L, Echeverri F, Mahboubi A, and Green DR (1998). DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappa B and AP-1. *Mol Cell,* **1**(4):543-51.
- Kasof GM, and Gomes BC (2001). Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *J Biol Chem.,* **276**(5):3238–46.
- Kass GE, Eriksson JE, Weis M, Orrenius S, and Chow SC (1996). Chromatin condensation during apoptosis requires ATP. *Biochem J.,* **318**(Pt 3):749-52.
- Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, and Poirier GG (1993). Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.,* **53**(17):3976-85.
- Kaufmann T, Schlipf S, Sanz J, Neubert K, Stein R, and 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**(1):53-64. Epub 2003 Jan 6.
- Kawanishi M (1997). Epstein–Barr virus BHRF1 protein protects intestine 407 epithelial cells from apoptosis induced by tumor necrosis factor alpha and anti-Fas antibody. *Journal of Virology,* **71**(4):3319-22.
- Ke N, Godzik A, and Reed JC (2001). Bcl-B, a novel Bcl-2 family member that differentially binds and regulates Bax and Bak. *J Biol Chem.,* **276**(16):12481-4. Epub 2001 Feb 21.
- Kelekar A, Chang BS, Harlan JE, Fesik SW, and Thompson CB (1997). Bad is a BH3 domain-containing protein that forms an inactivating dimer with Bcl-XL. *Mol Cell Biol.,* **17**(12):7040-6.
- Kelekar A, and Thompson CB (1998). Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol.,* **8**(8):324-30.
- Kerr JF, Wyllie AH, and Currie AR (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* **26**(4):239-57.
- Kiefer MC, Brauer MJ, Powers VC, Wu JJ, Umansky SR, Tomei LD, and Barr PJ (1995). Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. *Nature,* **374**(6524):736-9.
- Kim JK, Kim KS, Ahn JY, Kim NK, Chung HM, Yun HJ, and Cha KY (2004). Enhanced apoptosis by a novel gene, Bak-like, that lacks the BH3 domain. *Biochem Biophys Res Commun.,* **316**(1):18-23.
- Kim PK, Annis MG, Dlugosz PJ, Leber B, and Andrews DW (2004). During apoptosis bcl-2 changes membrane topology at both the endoplasmic reticulum and mitochondria. *Mol Cell.,* **14**(4):523-9.
- Kirkin V, Joos S, and Zornig M (2004). The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta.,* **1644**(2-3):229-49. Review.
- Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, and Peter ME (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.,* **14**(22):5579-88.
- Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, Schow P, Kim KJ, and Ashkenazi A (2000). Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity,* **12**(6):611-20.

- Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A, LeBlanc H, Virmani A, Schow P, Gazdar A, Blenis J, Arnott D, and Ashkenazi A (2001). Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J Biol Chem.,* **276**(49):46639-46.
- Kitada S, Leone M, Sareth S, Zhai D, Reed JC, and Pellecchia M (2003). Discovery, characterization, and structure-activity relationships studies of proapoptotic polyphenols targeting B-cell lymphocyte/leukemia-2 proteins. *J Med Chem.,* **46**(20):4259-64.
- Kitamura Y, Shimohama S, Kamoshima W, Ota T, Matsuoka Y, Nomura Y, Smith MA, Perry G, Whitehouse PJ, and Taniguchi T (1998). Alteration of proteins regulating apoptosis, Bcl-2, Bcl-x, Bax, Bak, Bad, ICH-1 and CPP32, in Alzheimer's disease. *Brain Res.,* **780**(2):260-9.
- Kitson J, Raven T, Jiang YP, Goeddel DV, Giles KM, Pun KT, Grinham CJ, Brown R, and Farrow SN (1996). A death-domain-containing receptor that mediates apoptosis. *Nature,* **384**(6607):372-5.
- Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, and Newmeyer DD (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science,* **275**(5303):1132-6.
- Knudson CM, Tung KS, Tourtellotte WG, Brown GA, and Korsmeyer SJ (1995). Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science,* **270**(5233):96-9.
- Kokoszka JE, Waymire KG, Levy SE, Sligh JE, Cai J, Jones DP, MacGregor GR, and Wallace DC (2004). The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature,* **427**(6973):461-5.
- Komiyama T, Ray CA, Pickup DJ, Howard AD, Thornberry NA, Peterson EP, and Salvesen G (1994). Inhibition of interleukin-1 beta converting enzyme by the cowpox virus serpin CrmA. An example of cross-class inhibition. *J Biol Chem.,* **269**(30):19331-7.
- Konopleva M, Tari AM, Estrov Z, Harris D, Xie Z, Zhao S, Lopez-Berestein G, and Andreeff M (2000). Liposomal Bcl-2 antisense oligonucleotides enhance proliferation, sensitize acute myeloid leukemia to cytosine-arabinoside, and induce apoptosis independent of other antiapoptotic proteins. *Blood,* **95**(12):3929-38.
- Koonin E, and Aravind L (2002). Origin and evolution of eukaryotic apoptosis : the bacterial connection. *Cell Death Differ.,* **9**(4):394-404. Review.
- Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, and Schlesinger PH. (2000). Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ.,* **7**(12):1166-73. Review.
- Kozopas KM, Yang T, Buchan HL, Zhou P, and Craig RW (1993). MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A.,* **90**(8):3516-20.
- Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, Schibler MJ, Fenton W, and Reed JC (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**(19):4701-4714.
- Krajewski S, Blomqvist C, Franssila K, Krajewska M, Wasenius VM, Niskanen E, Nordling S, and Reed JC (1995). Reduced expression of proapoptotic gene BAX is associated with poor response rates to combination chemotherapy and shorter survival in women with metastatic breast adenocarcinoma. *Cancer Res.,* **55**(19):4471-8.
- Krammer PH (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature,* **407**(6805):789-95.
- Kroemer G, Zamzami N, and Susin SA (1998b). Mitochondrial control of apoptosis. *Immunology Today*, **18**(1):44-51. Review.

- Kuida K, Lippke JA, Ku G, Harding MW, Livingston DJ, Su MS, and Flavell RA (1995). Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science,* **267**(5206):2000-3.
- Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuan C, Yang D, Karasuyama H, Rakic P, and Flavell RA (1996). Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature,* **384**(6607):368-72.
- Kuida K, Haydar TF, Kuan CY, Gu Y, Taya C, Karasuyama H, Su MS, Rakic P, and Flavell RA (1998). Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell,* **94**(3):325-37.
- Kumar A, Commane M, Flickinger TW, Horvath CM, and Stark GR (1997). Defective TNF-alpha-induced apoptosis in STAT1-null cells due to low constitutive levels of caspases. *Science,* **278**(5343):1630-2.
- Kundu S, and Jernigan RL (2004). Molecular mechanism of domain swapping in proteins: an analysis of slower motions. Biophys J. 2004 Jun;86(6):3846-54.
- Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, Ellisman MH, Latterich M, Schneiter R, Green DR, and Newmeyer DD (2002). Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell,* **111**(3):331-42.
- Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, Bonzon C, Sullivan BA, Green DR, and Newmeyer DD (2005). BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell.,* **17**(4):525-35.
- Kwon BS, and Weissman SM (1989). cDNA sequences of two inducible T-cell genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.,* **86**(6):1963-7.

L

- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature,* **227**(5259):680-5.
- Lagace M, Xuan JY, Young SS, McRoberts C, Maier J, Rajcan-Separovic E, and Korneluk RG (2001). Genomic organization of the X-linked inhibitor of apoptosis and identification of a novel testis-specific transcript.*Genomics,* **77**(3):181–8.
- Lalier L, Cartron PF, Pedelaborde F, Olivier C, Loussouarn D, Meflah K, Menanteau J, and Vallette FM (2006). PGE_2 induces a Bax-dependent apoptosis correlated to patients' survival in *Glioblastoma multiform. Proc Natl Acad Sci U S A.* (soumis).
- Lamkanfi M, Declercq W, Kalai M, Saelens X, and Vandenabeele P (2002). Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell Death Differ.,* **9**(4):358-61.
- Lavrik IN, Golks A, and Krammer PH (2005). Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest.,* **115**(10):2665-72. Review.
- LeBrun DP, Warnke RA, and Cleary ML (1993). Expression of bcl-2 in fetal tissues suggests a role in morphogenesis. *Am J Pathol.,* **142**(3):743-53.
- Lee JU, Hosotani R, Wada M, Doi R, Kosiba T, Fujimoto K, Miyamoto Y, Tsuji S, Nakajima S, Nishimura Y, Imamura M. (1999). Role of Bcl-2 family proteins (Bax, Bcl-2 and Bcl-X) on cellular susceptibility to radiation in pancreatic cancer cells. *Eur J Cancer.,* **35**(9):1374-80.
- Leist M, Gantner F, Bohlinger I, Tiegs G, Germann PG, and Wendel A (1995). Tumor necrosis factor-induced hepatocyte apoptosis precedes liver failure in experimental murine shock models. *Am J Pathol.,* **146**(5):1220-34.

- Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S, and Nicotera P (1997). Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptotsis and necrosis. *J Exp Med.,* **185**(8):1481-6.
- Leone M, Zhai D, Sareth S, Kitada S, Reed JC, and Pellecchia M (2003). Cancer prevention by tea polyphenols is linked to their direct inhibition of antiapoptotic Bcl-2-family proteins. *Cancer Res.* **63**(23):8118-21.
- Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, and Korsmeyer SJ (2002). Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell,* **2**(3):183-92.
- Lewis S, Bethell SS, Patel S, Martinou JC, and Antonsson B (1998). Purification and biochemical properties of soluble recombinant human Bax. *Protein Expr Purif.,* **13**(1):120-6.
- Li B, and Dou QP (2000). Bax degradation by the ubiquitin/proteasome-dependent pathway: involvement in tumor survival and progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.,* **97**(8):3850-5.
- Li H, Zhu H, Xu CJ, and Yuan J (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell,* **94**(4):491-501.
- Li LY, Luo X, and Wang X (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature,* **412**(6842):95-9.
- Li P, Allen H, Banerjee S, Franklin S, Herzog L, Johnston C, McDowell J, Paskind M, Rodman L, Salfeld J, and *et al.* (1995). Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. *Cell,* **80**(3):401-11.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, and Wang X (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell,* **91**(4):479-89. Comment in: *Cell* (2004), **116**(2 Suppl):S57-9, 2 p following S59.
- Li X, Yang Y, and Ashwell JD (2002). TNF-RII and c-IAP1 mediate ubiquitination and degradation of TRAF2. *Nature,* **416**(6878):345-7.
- Liedtke C, Groger N, Manns MP, and Trautwein C (2003). The human caspase-8 promoter sustains basal activity through SP1 and ETS-like transcription factors and can be up-regulated by a p53-dependent mechanism. *J Biol Chem.,* **278**(30):27593-604. Epub 2003 May 14.
- Lim ML, Lum MG, Hansen TM, Roucou X, and Nagley P (2002). On the release of cytochrome c from mitochondria during cell death signaling. *J Biomed Sci.,* **9**(6 Pt 1):488-506.
- Lima RT, Martins LM, Guimaraes JE, Sambade C, and Vasconcelos MH (2004). Specific downregulation of bcl-2 and xIAP by RNAi enhances the effects of chemotherapeutic agents in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Gene Ther.,* **11**(5):309-16.
- Limpens J, de Jong D, van Krieken JH, Price CG, Young BD, van Ommen GJ, and Kluin PM (1991). Bcl-2/JH rearrangements in benign lymphoid tissues with follicular hyperplasia. *Oncogene,* **6**(12):2271-6.
- Limpens J, Stad R, Vos C, de Vlaam C, de Jong D, van Ommen GJ, Schuuring E, and Kluin PM (1995). Lymphoma-associated translocation t(14;18) in blood B cells of normal individuals. *Blood,* **85**(9):2528-36.
- Lin A (2003). Activation of the JNK signaling pathway: breaking the brake on apoptosis. *Bioessays.* **25**(1):17-24.
- Lin EY, Orlofsky A, Berger MS, and Prystowsky MB (1993). Characterization of A1, a novel hemopoietic-specific early-response gene with sequence similarity to bcl-2. *J Immunol.,* **151**(4):1979-88.
- Lin JH, Deng G, Huang Q and Morser J (2000). KIAP, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family. *Biochem Biophys Res Commun.,* **279**(3):820–31.

- Lindeberg M, Zakharov SD, and Cramer WA (2000). Unfolding pathway of the colicin E1 channel protein on a membrane surface. *J Mol Biol.,* **295**(3):679-92
- Lindsten T, Ross AJ, King A, Zong WX, Rathmell JC, Shiels HA, Ulrich E, Waymire KG, Mahar P, Frauwirth K, Chen Y, Wei M, Eng VM, Adelman DM, Simon MC, Ma A, Golden JA, Evan G, Korsmeyer SJ, MacGregor GR, and Thompson CB (2000). The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell.,* **6**(6):1389-99.
- Liossis SN, Ding XZ, Kiang JG, and Tsokos GC (1997). Overexpression of the heat shock protein 70 enhances the TCR/CD3- and Fas/Apo-1/CD95-mediated apoptotic cell death in Jurkat T cells. *J Immunol.,* **158**(12):5668-75.
- Lippens S, Kockx M, Knaapen M, Mortier L, Polakowska R, Verheyen A, Garmyn M, Zwijsen A, Formstecher P, Huylebroeck D, Vandenabeele P, and Declercq W (2000). Epidermal differentiation does not involve the pro-apoptotic executioner caspases, but is associated with caspase-14 induction and processing. *Cell Death Differ.,* **7**(12):1218-24.
- Liston P, Roy N, Tamai K, Lefebvre C, Baird S, Cherton-Horvat G, Farahani R, McLean M, Ikeda JE, MacKenzie A, and Korneluk RG (1996). Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature,* **379**(6563):349-53.
- Liston P, Fong WG, and Korneluk RG (2003). The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. *Oncogene,* **22**(53):8568–80.
- Lithgow T, van Driel R, Bertram JF, and 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**(4):411-7.
- Liu QA, and Hengartner MO (1999). The molecular mechanism of programmed cell death in C. elegans. *Ann N Y Acad Sci.,* **887**:92-104.
- Liu W, Wang G, and Yakovlev AG (2002). Identification and functional analysis of the rat caspase-3 gene promoter. *J Biol Chem.,* **277**(10):8273-8. Epub 2001 Dec 28.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, and Wang X (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement of dATP and cytochrome c. *Cell,* **86**(1):147-57.
- Liu X, Zou H, Slaughter C and Wang X (1997). DFF40, a heterodimeric protein that functions downstream of Caspase 3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell*, **89**(2):175-84.
- Liu X, Li P, Widlak P, Zou H, Luo X, Garrard WT, and Wang X (1998). The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**(15):8461-6.
- Liu X, Dai S, Zhu Y, Marrack P, and Kappler JW (2003). The structure of a Bcl-xL/Bim fragment complex: implications for Bim function. *Immunity,* **19**(3):341-52.
- Liu Y, and Eisenberg D (2002). 3D domain swapping: as domains continue to swap. *Protein Sci.,* **11**(6):1285-99. Review.
- Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV, and Karin M (1996). Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell,* **87**(3):565-76.
- Lockshin RA, and Williams CM (1965a). Programmed cell death: I. Cytology of the degeneration of the intersegmental muscles of the *Pernyi* silkmoth. *J Insect Physiol.,* **11**:123-33.
- Lockshin RA, and Williams CM (1965b). Programmed cell death : II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmoths. *J Insect Physiol.,* **10**:643-9.

- Lockshin RA, and Williams CM (1965c). Programmed cell death. V. Cytolytic enzymes in relation to the breakdown of the intersegmental muscles of silkmoths. *J Insect Physiol.,* **11**:831-44.
- Lockshin RA, and Zakeri Z (2002). Caspase-independent cell deaths. *Curr Opin Cell Biol.,* **14**(6):727-33. Review.
- Loetscher H, Pan YC, Lahm HW, Gentz R, Brockhaus M, Tabuchi H, and Lesslauer W (1990). Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor. *Cell,* **61**(2):351-9.
- Longthorne VL, and Williams GT (1997). Caspase activity is required for commitment to Fas-mediated apoptosis. *Embo J.*, **16**(13):3805-12.
- Lopes de Menezes DE, and Mayer LD (2002). Pharmacokinetics of Bcl-2 antisense oligonucleotide (G3139) combined with doxorubicin in SCID mice bearing human breast cancer solid tumor xenografts. *Cancer Chemother Pharmacol.,* **49**(1):57-68.
- Lopez-Hoyos M, Carrio R, Merino J, and Merino R (1998). Regulation of B cell apoptosis by Bcl-2 and Bcl-XL and its role in the development of autoimmune diseases. *Int J Mol Med.,* **1**(2):475-83. Review.
- Lorenzo HK, Susin SA, Penninger J, and Kroemer G (1999). Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ.,* **6**(6):516-24.
- Los M, Wesselborg S, and Schulze-Osthoff K (1999). The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice. *Immunity,* **10**(6):629-39.
- Losonczi JA, Olejniczak ET, Betz SF, Harlan JE, Mack J, and Fesik SW (2000). NMR studies of the anti-apoptotic protein Bcl-xL in micelles. *Biochemistry,* **39**(36):11024-33.
- Lowe SL, Rubinchik S, Honda T, McDonnell TJ, Dong JY, and Norris JS (2001). Prostate-specific expression of Bax delivered by an adenoviral vector induces apoptosis in LNCaP prostate cancer cells. *Gene Ther.,* **8**(18):1363-71.
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, and Wang X (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell,* **94**(4):481-90.
- Lutter M, Fang M, Luo X, Nishijima M, Xie X, and Wang X (2000). Cardiolipin provides specificity for targeting of tBid to mitochondria. *Nat Cell Biol.,* **2**(10):754-61.
- Lutter M, Perkins GA, and Wang X (2001). The pro-apoptotic Bcl-2 family member tBid localizes to mitochondrial contact sites. *BMC Cell Biol.,* **2**:22. Epub 2001 Nov 8.
- Luzi E, Papucci L, Schiavone N, Donnini M, Lapucci A, Tempestini A, Witort E, Nicolin A, and Capaccioli S (2003). Downregulation of bcl-2 expression in lymphoma cells by bcl-2 ARE-targeted modified, synthetic ribozyme. *Cancer Gene Ther.,* **10**(3):201-8.

M

- MacFarlane M, Merrison W, Bratton SB, and Cohen GM (2002). Proteasome-mediated degradation of Smac during apoptosis: XIAP promotes Smac ubiquitination in vitro. *J Biol Chem.* **277**(39):36611-6. Epub 2002 Jul 16.
- MacLachlan TK, and El-Deiry WS (2002). Apoptotic threshold is lowered by p53 transactivation of caspase-6. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**(14):9492-7. Epub 2002 Jun 27.
- Madeo F, Herker E, Maldener C, Wissing S, Lachelt S, Herlan M, Fehr M, Lauber K, Sigrist SJ, Wesselborg S, and Frohlich KU (2002). A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol Cell,* **9**(4):911-7.

- Madesh M, Antonsson B, Srinivasula SM, Alnemri ES, and Hajnoczky G (2002). Rapid kinetics of tBid-induced cytochrome c and Smac/DIABLO release and mitochondrial depolarization. *J Biol Chem.,* **277**(7):5651-9.
- Maejima Y, Adachi S, Morikawa K, Ito H, and Isobe M (2005). Nitric oxide inhibits myocardial apoptosis by preventing caspase-3 activity via S-nitrosylation. *J Mol Cell Cardiol.,* **38**(1):163-74. Epub 2004 Dec 8.
- Maier JK, Lahoua Z, Gendron NH, Fetni R, Johnston A, Davoodi J, Rasper D, Roy S, Slack RS, Nicholson DW, and MacKenzie AE (2002). The neuronal apoptosis inhibitory protein is a direct inhibitor of caspases 3 and 7. *J Neurosci.,* **22**(6):2035-43.
- Makin G, and Hickman JA (2000). Apoptosis and cancer chemotherapy. *Cell Tissue Res.,* **301**(1):143-52.
- Makin GW, Corfe BM, Griffiths GJ, Thistlethwaite A, Hickman JA, and Dive C (2001). Damage-induced Bax N-terminal change, translocation to mitochondria and formation of Bax dimers/complexes occur regardless of cell fate. *EMBO J.,* **20**(22):6306-15.
- Mallett S, Fossum S, and Barclay AN (1990). Characterization of the MRC OX40 antigen of activated CD4 positive T lymphocytes--a molecule related to nerve growth factor receptor. *Embo J.,* **9**(4):1063-8.
- Manero F, Gautier F, Gallenne T, Cauquil N, Gree D, Cartron PF, Geneste O, Gree R, Vallette FM, and Juin P (2006). The small organic compound HA14-1 prevents Bcl-2 interaction with Bax to sensitize malignant glioma cells to induction of cell death. *Cancer Res.,* **66**(5):2757-64.
- Manganelli P, and Fietta P (2003). Apoptosis and Sjogren syndrome. *Semin Arthritis Rheum.* **33**(1):49-65. Review.
- Mannick JB, Hausladen A, Liu L, Hess DT, Zeng M, Miao QX, Kane LS, Gow AJ, and Stamler JS (1999). Fas-induced caspase denitrosylation. *Science,* **284**(5414):651–4.
- Mannick JB, Schonhoff C, Papeta N, Ghafourifar P, Szibor M, Fang K, Gaston B (2001). S-Nitrosylation of mitochondrial caspases. *J Cell Biol.* **154**(6):1111-6. Epub 2001 Sep 10.
- Marchetti P, Hirsch T, Zamzami N, Castedo M, Decaudin D, Susin SA, Masse B, and Kroemer G (1996). Mitochondrial permeability transition triggers lymphocyte apoptosis. *J Immunol.,* **157**(11):4830-6.
- Marriott JB, Clarke IA, Czajka A, Dredge K, Childs K, Man HW, Schafer P, Govinda S, Muller GW, Stirling DI, and Dalgleish AG (2003). A novel subclass of thalidomide analogue with anti-solid tumor activity in which caspase-dependent apoptosis is associated with altered expression of bcl-2 family proteins. *Cancer Res.,* **63**(3):593-9.
- Martinez-Caballero S, Dejean LM, and Kinnally KW (2004). Some amphiphilic cations block the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC. *FEBS Lett.,* **568**(1-3):35-8.
- Martinez-Caballero S, Dejean LM, Jonas EA, and Kinnally KW (2005). The role of the mitochondrial apoptosis induced channel MAC in cytochrome c release. *J Bioenerg Biomembr.,* **37**(3):155-64. Review.
- Martinon F, Burns K, and Tschopp J (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell,* **10**(2):417-26.
- Martinou JC, Desagher S, Antonsson B (2000). Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing. *Nat Cell Biol.,* 2(3):E41-3.
- Martinou J, and Green D (2001). Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol.,* **2**(1):63–7.
- Martins LM, Iaccarino I, Tenev T, Gschmeissner S, Totty NF, Lemoine NR, Savopoulos J, Gray CW, Creasy CL, Dingwall C, and Downward J (2002). The serine protease Omi/HtrA2

regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif. *J Biol Chem.,* **277**(1):439-44.

- Marsters SA, Sheridan JP, Donahue CJ, Pitti RM, Gray CL, Goddard AD, Bauer KD, and Ashkenazi A (1996). Apo-3, a new member of the tumor necrosis factor receptor family, contains a death domain and activates apoptosis and NF-kappa B. *Curr Biol.,* **6**(12):1669-76.
- Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jurgensmeier JM, Susin SA, Vieira HL, Prevost MC, Xie Z, Matsuyama S, Reed JC, and Kroemer G (1998). Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science,* **281**(5385):2027-31.
- Mashima T, Naito M, Noguchi K, Miller DK, Nicholson DW, and Tsuruo T (1997). Actin cleavage by CPP-32/apopain during the development of apoptosis. *Oncogene,* **14**(9):1007-12.
- Mate MJ, Ortiz-Lombardia M, Boitel B, Haouz A, Tello D, Susin SA, Penninger J, Kroemer G, and Alzari PM (2002). The crystal structure of the mouse apoptosis-inducing factor AIF. *Nat Struct Biol.,* **9**(6):442-6.
- Mateo V, Lagneaux L, Bron D, Biron G, Armant M, Delespesse G, and Sarfati M (1999). CD47 ligation induces caspase-independent cell death in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Med.,* **5**(11):1277-84.
- Mathiasen IS, Lademann U, and Jaattela M (1999). Apoptosis induced by vitamin D compounds in breast cancer cells is inhibited by Bcl-2 but does not involve known caspases or p53. *Cancer Res.,* **59**(19):4848-56.
- Matsushima M, Fujiwara T, Takahashi E, Minaguchi T, Eguchi Y, Tsujimoto Y, Suzumori K, and Nakamura Y (1998). Isolation, mapping, and functional analysis of a novel human cDNA (BNIP3L) encoding a protein homologous to human NIP3. *Genes Chromosomes Cancer,* **21**(3):230-5.
- McCarthy JV, Ni J, and Dixit VM (1998). RIP2 is a novel NF-kappaB-activating and cell death-inducing kinase. *J Biol Chem.,* **273**(27):16968-75.
- McCarthy NJ, Whyte MK, Gilbert CS, and Evan GI (1997). Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak. *J Cell Biol.,* **136**(1):215-27.
- McCurrach ME, Connor TM, Knudson CM, Korsmeyer SJ, and Lowe SW (1997). Bax-deficiency promotes drug resistnace and oncogenic transformation by attenuating p53-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*., **94**(6):2345-9.
- McDonnell JM, Fushman D, Milliman CL, Korsmeyer SJ, and Cowburn D (1999). Solution structure of the proapoptotic molecule BID: a structural basis for apoptotic agonists and antagonists. *Cell,* **96**(5):625-34.
- Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH, and Peter ME (1997). FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J.*, **16**(10):2794-804.
- Meier P, Finch A, and Evan G (2000). Apoptosis in development. *Nature,* **407**(6805):796-801.
- Meijerink JP, Mensink EJ, Wang K, Sedlak TW, Sloetjes AW, de Witte T, Waksman G, and Korsmeyer SJ (1998). Hematopoietics malignancies demonstrate loss-of-function mutations of BAX. *Blood,* **91**(8):2991-7.
- Mercatante DR, Mohler JL, and Kole R (2002). Cellular response to an antisense-mediated shift of Bcl-x pre-mRNA splicing and antineoplastic agents. *J Biol Chem.,* **277**(51):49374-82.
- Micheau O, Hammann A, Solary E, and Dimanche-Boitrel MT (1999). STAT-1-independent upregulation of FADD and procaspase-3 and -8 in cancer cells treated with cytotoxic drugs. *Biochem Biophys Res Commun.,* **256**(3):603-7.

- Mignotte B, Colin J, Brun S and Guénal I. "Apoptosis: the fly point of view". In /Apoptosis/ Scovassi AI (ed.), Research Signpost, Kerala, India. ISBN: 81-308-0021-7. (2005) pp169-86.
- Mikhailov V, Mikhailova M, Pulkrabek DJ, Dong Z, Venkatachalam MA, and Saikumar P (2001). Bcl-2 prevents Bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem.,* **276**(21):18361-74. Epub 2001 Feb 20.
- Mikhailov V, Mikhailova M, Degenhardt K, Venkatachalam MA, White E, and 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**(7):5367-76. Epub 2002 Nov 25.
- Minn AJ, Velez P, Schendel SL, Liang H, Muchmore SW, Fesik SW, Fill M, and Thompson CB (1997). Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature,* **385**(6614):353-7.
- Miramar MD, Costantini P, Ravagnan L, Saraiva LM, Haouzi D, Brothers G, Penninger JM, Peleato ML, Kroemer G, and Susin SA (2001). NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *J Biol Chem.,* **276**(19):16391-8.
- Mittl PR, Di Marco S, Krebs JF, Bai X, Karanewsky DS, Priestle JP, Tomaselli KJ, and Grutter MG (1997). Structure of recombinant human CPP32 in complex with the tetrapeptide acetyl-Asp-Val-Ala-Asp fluoromethyl ketone. *J Biol Chem.,* **272**(10):6539-47.
- Miyashita T, and Reed JC (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell,* **80**(2):293-9.
- Mogi M, and Togari A (2003). Activation of caspases is required for osteoblastic differentiation. *J Biol Chem.,* **278**(48):47477-82. Epub 2003 Sep 3.
- Monaghan P, Robertson D, Amos TA, Dyer MJ, Mason DY, and Greaves MF (1992). Ultrastructural localization of bcl-2 protein. *J Histochem Cytochem.,* 40(12):1819-25.
- Montessuit S, Mazzei G, Magnenat E, and Antonsson B (1999). Expression and purification of full-length human Bax alpha. *Protein Expr Purif.,* **15**(2):202-6.
- Morioka K, Tone S, Mukaida M, and Takano-Ohmuro H (1998). The apoptotic and nonapoptotic nature of the terminal differentiation of erythroid cells. *Exp Cell Res.,* **240**(2):206-17.
- Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Denis-Larose C, and Massie B (1997). Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol.,* **17**(9):5317-27.
- Motoyama N, Wang F, Roth KA, Sawa H, Nakayama K, Negishi I, Senju S, Zhang Q, Fujii S, and *et al.* (1995). Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science,* **267**(5203):1506-10.
- Motz C, Martin H, Krimmer T, and Rassow J (2002). Bcl-2 and porin follow different pathways of TOM-dependent insertion into the mitochondrial outer membrane. *J Mol Biol.,* **323**(4):729-38.
- Mounier N, Briere J, Gisselbrecht C, Emile JF, Lederlin P, Sebban C, Berger F, Bosly A, Morel P, Tilly H, Bouabdallah R, Reyes F, Gaulard P, and Coiffier B (2003). Rituximab plus CHOP (R-CHOP) overcomes bcl-2--associated resistance to chemotherapy in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Blood,* **101**(11):4279-84.
- Muchmore SW, Sattler M, Liang H, Meadows RP, Harlan JE, Yoon HS, Nettesheim D, Chang BS, Thompson CB, Wong SL, Ng SL, and Fesik SW (1996). X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature,* **381**(6580):335-41.
- Müllauer L, Gruber P, Sebinger D, Buch J, Wohlfart S, and Chott A (2001). Mutations in apoptosis genes: a pathogenetic factor for human disease. *Mutat Res.,* **488**(3):211-31.
- Murray AJ, Lewis SJ, Barclay AN, and Brady RL (1995). One sequence, two folds: a metastable structure of CD2. *Proc Natl Acad Sci U S A.,* **92**(16):7337-41.

• Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, and Dixit VM (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell,* **85**(6):817-27.

N

• Nachmias B, Ashhab Y, Bucholtz V, Drize O, Kadouri L, Lotem M, Peretz T, Mandelboim O, and Ben-Yehuda D (2003). Caspase-mediated cleavage converts Livin from an anti-apoptotic to a pro-apoptotic factor: implications for drugresistant melanoma. *Cancer Res.,* **63**(19):6340–9.

• Nachmias B, Ashhab Y, and Ben-Yehuda D (2004). The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer. *Semin Cancer Biol.,* **14**(4):231-43.

• Nagata S, and Golstein P (1995). The Fas death factor. *Science,* **267**(5203):1449-56.

• Nagata S, and Suda T (1995). Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. *Immunol. Today* **16**(1):39-43. Review.

• Nagata S (1997). Apoptosis by death factor. *Cell,* **88**(3):355-65. Review.

• Nahle Z, Polakoff J, Davuluri RV, McCurrach ME, Jacobson MD, Narita M, Zhang MQ, Lazebnik Y, Bar-Sagi D, and Lowe SW (2002). Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F. *Nat Cell Biol.,* **4**(11):859-64.

• Naik P, Karrim J, and Hanahan D (1996). The rise and fall of apoptosis during multistage tumorigenesis: down-modulation contributes to tumor progression from angiogenic progenitors. *Genes Dev.,* **10**(17):2105-16.

• Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, and Yuan J (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature,* **403**(6765):98-103.

• Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi O, Otsu K, Yamagata H, Inohara H, Kubo T, and Tsujimoto Y (2005). Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature,* **434**(7033):652-8. Comment in: *Nature,* **434**(7033):578-9.

• Nakano K, and Vousden KH (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell,* **7**(3):683-94.

• Nakayama K, Negishi I, Kuida K, Sawa H, and Loh DY (1994). Targeted disruption of Bcl-2 alpha beta in mice: occurrence of gray hair, polycystic kidney disease, and lymphocytopenia. *Proc Natl Acad Sci U S A.,* **91**(9):3700-4.

• Nechushtan A, Smith CL, Hsu YT, and Youle RJ (1999). Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. *EMBO J.,* **18**(9):2330-41.

• Nechushtan A, Smith CL, Lamensdorf I, Yoon SH, and Youle RJ (2001). Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *J Cell Biol.,* **153**(6):1265-1276.

• Newcomer ME (2002). Protein folding and three-dimensional domain swapping: a strained relationship? *Curr Opin Struct Biol.,* **12**(1):48-53. Review.

• Newmeyer DD, and Ferguson-Miller S (2003). Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell,* **112**(4):481-90. Review. Erratum in: *Cell,* (112)6:873.

• Newton K, Harris AW, Bath ML, Smith KG, and Strasser A (1998). A dominant interfering mutant of FADD/MORT1 enhances deletion of autoreactive thymocytes and inhibits proliferation of mature T lymphocytes. *Embo J.*, **17**(3):706-18.

- Nguyen M, Millar DG, Yong VW, Korsmeyer SJ, and Shore GC (1993). Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *J Biol Chem.,* **268**(34):25265-8.
- Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, and *et al.* (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature,* **376**(6535):37-43.Comment in: *Nature,* **376**(6535):17-8.
- Nicholson DW, and Thornberry NA (1997). Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci.,* **22**(8):299-306.
- Nicholson DW (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.,* **6**(11):1028-42.
- Nobel CS, Burgess DH, Zhivotovsky B, Burkitt MJ, Orrenius S, and Slater AF (1997). Mechanism of dithiocarbamate inhibition of apoptosis: thiol oxidation by dithiocarbamate disulfides directly inhibits processing of the caspase-3 proenzyme. *Chem Res Toxicol.,* **10**(6):636-43.
- Nouraini S, Six E, Matsuyama S, Krajewski S, and Reed JC (2000). The putative pore-forming domain of Bax regulates mitochondrial localization and interaction with Bcl-X(L). *Mol Cell Biol.,* **20**(5):1604-15.
- Nunez G, Merino R, Grillot D, and Gonzalez-Garcia M (1994). Bcl-2 and Bcl-x: regulatory switches for lymphoid death and survival. *Immunol. Today,* **15**(12):582-8. Review.
- Nutt LK, Pataer A, Pahler J, Fang B, Roth J, McConkey DJ, and Swisher SG (2002). Bax and Bak promote apoptosis by modulating endoplasmic reticular and mitochondrial Ca2+ stores. *J Biol Chem.,* **277**(11):9219-25. Epub 2001 Dec 6.

O

- O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, Hausmann G, Adams JM, Cory S, and Huang DC (1998). Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *Embo J.,* **17**(2):384-95.
- Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, and Tanaka N (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science,* **288**(5468):1053-8.
- Oehm A, Behrmann I, Falk W, Pawlita M, Maier G, Klas C, Li-Weber M, Richards S, Dhein J, Trauth BC, and *et al.* (1992). Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J Biol Chem.,* **267**(15):10709-15.
- Oesterreich S, Weng CN, Qiu M, Hilsenbeck SG, Osborne CK, and Fuqua SA (1993). The small heat shock protein hsp27 is correlated with growth and drug resistance in human breast cancer cell lines. *Cancer Res.,* **53**(19):4443-8.
- Olie RA, Hafner C, Kuttel R, Sigrist B, Willers J, Dummer R, Hall J, Stahel RA, and Zangemeister-Wittke U (2002). Bcl-2 and bcl-xL antisense oligonucleotides induce apoptosis in melanoma cells of different clinical stages. *J Invest Dermatol.,* **118**(3):505-12.
- Oliver L, Priault M, Tremblais K, LeCabellec M, Meflah K, Manon S, and Vallette FM (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**(2):161-5.
- Oliver L, LeCabellec MT, Pradal G, Meflah K, Kroemer G, and Vallette FM (2005). Constitutive presence of cytochrome c in the cytosol of a chemoresistant leukemic cell line. *Apoptosis,* **10**(2):277-87.

- Oliver L, and Vallette FM (2005). The role of caspases in cell death and differentiation. *Drug Resist Updat.,* **8**(3):163-70. Review.
- Oltvai ZN, Milliman CL, and Korsmeyer SJ (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell,* **74**(4):609-19.
- Oltvai ZN, and Korsmeyer SJ (1994). Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. *Cell,* **79**(2):189-92. Comment on: *Cell,* **79**(2):329-39 ; *Cell,* **79**(2):341-51 ; *Cell,* **79**(2):353-64.
- O'Neill JW, Manion MK, Maguire B, and Hockenbery DM (2006). BCL-XL dimerization by three-dimensional domain swapping. *J Mol Biol.,* **356**(2):367-81. Epub 2005 Dec 1.
- O'Reilly LA, Print C, Hausmann G, Moriishi K, Cory S, Huang DC, and Strasser A (2001). Tissue expression and subcellular localization of the pro-survival molecule Bcl-w. *Cell Death Differ.,* **8**(5):486-94.
- Orner BP, Ernst JT, and Hamilton AD (2001). Toward proteomimetics: terphenyl derivatives as structural and functional mimics of extended regions of an alpha-helix. *J Am Chem Soc.*, **123**(22):5382-3.
- Ott M, Robertson JD, Gogvadze V, Zhivotovsky B, and Orrenius S (2002). Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc Natl Acad Sci U S A.,* **99**(3):1259-63. Epub 2002 Jan 29.
- Ottilie S, Diaz JL, Horne W, Chang J, Wang Y, Wilson G, Chang S, Weeks S, Fritz LC, and Oltersdorf T (1997). Dimerization properties of human BAD. Identification of a BH-3 domain and analysis of its binding to mutant BCL-2 and BCL-XL proteins. *J Biol Chem.,* **272**(49):30866-72.

P

- Palaga T, and Osborne B (2002). The 3D's of apoptosis: death, degradation and DIAPs. *Nat Cell Biol.,* **4**(6):E149–51.
- Palumbo GJ, Pickup DJ, Fredrickson TN, McIntyre LJ, and Buller RM (1989). Inhibition of an inflammatory response is mediated by a 38-kDa protein of cowpox virus. *Virology,* **172**(1):262-73.
- Pan G, Ni J, Wei YF, Yu G, Gentz R, and Dixit VM (1997). An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science,* **277**(5327):815-8.
- Pan G, Bauer JH, Haridas V, Wang S, Liu D, Yu G, Vincenz C, Aggarwal BB, Ni J, and Dixit VM (1998a). Identification and functional characterization of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor. *FEBS Lett.,* **431**(3):351-6.
- Pan G, O'Rourke K, and Dixit VM (1998b). Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex. *J Biol Chem.,* **273**(10):5841-5.
- Panaretakis T, Pokrovskaja K, Shoshan MC, and Grander D (2002). Activation of Bak, Bax, and BH3-only proteins in the apoptotic response to doxorubicin. *J Biol Chem.,* **277**(46):44317-26.
- Pandey P, Farber R, Nakazawa A, Kumar S, Bharti A, Nalin C, Weichselbaum R, Kufe D, and Kharbanda S (2000). Hsp27 functions as a negative regulator of cytochrome c-dependent activation of procaspase-3. *Oncogene,* **19**(16):1975-81.
- Pardo J, Perez-Galan P, Gamen S, Marzo I, Monleon I, Kaspar AA, Susin SA, Kroemer G, Krensky AM, Naval J, and Anel A (2001). A role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in granulysin-induced apoptosis. *J Immunol.,* **167**(3):1222-9.
- Parker MW, Buckley JT, Postma JP, Tucker AD, Leonard K, Pattus F, and Tsernoglou D (1994). Structure of the Aeromonas toxin proaerolysin in its water-soluble and membrane-channel states. *Nature,* **367**(6460):292-5.

- Parrish J, Li L, Klotz K, Ledwich D, Wang X, and Xue D (2001). Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in C. elegans. *Nature,* **412**(6842):90-4. Comment in: *Nature,* **412**(6842):27, 29.
- Pataer A, Smythe WR, Yu R, Fang B, McDonnell T, Roth JA, and Swisher SG (2001). Adenovirus-mediated Bak gene transfer induces apoptosis in mesothelioma cell lines. *J Thorac Cardiovasc Surg.,* **121**(1):61-7.
- Pellecchia M, and Reed JC (2004). Inhibition of anti-apoptotic Bcl-2 family proteins by natural polyphenols: new avenues for cancer chemoprevention and chemotherapy. *Curr Pharm Des.,* **10**(12):1387-98. Review.
- Pelletier M, Cartron PF, Delaval F, Meflah K, Vallette FM, Oliver L (2004). Caspase 3 activation is controlled by a sequence located in the N-terminus of its large subunit. *Biochem Biophys Res Commun.,* **316**(1): 93–9.
- Pena JC, Rudin CM, and Thompson CB (1988). A Bcl-xL transgene promotes malignant conversion of chemically initiated skin papillomas. *Cancer Res.,* **58**(10):2111-6.
- Penault-Llorca F, Bouabdallah R, Devilard E, Charton-Bain MC, Hassoun J, Birg F, and Xerri L (1998). Analysis of BAX expression in human tissues using the anti-BAX, 4F11 monoclonal antibody on paraffin sections. Pathol Res Pract., **194**(7):457-64.
- Perfettini JL, and Kroemer G (2003). Caspase activation is not death. *Nat Immunol.,* **4**(4):308-10.
- Perfettini JL, Roumier T, and Kroemer G (2005). Mitochondrial fusion and fission in the control of apoptosis. *Trends Cell Biol.,* **15**(4):179-83. Review.
- Petros AM, Nettesheim DG, Wang Y, Olejniczak ET, Meadows RP, Mack J, Swift K, Matayoshi ED, Zhang H, Thompson CB, and Fesik SW (2000). Rationale for Bcl-xL/Bad peptide complex formation from structure, mutagenesis, and biophysical studies. Protein Sci., **9**(12):2528-34.
- Petros AM, Medek A, Nettesheim DG, Kim DH, Yoon HS, Swift K, Matayoshi ED, Oltersdorf T, and Fesik SW (2001). Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.,* **98**(6):3012-7. Epub 2001 Feb 27.
- Petros AM, Olejniczak ET, and Fesik SW (2004). Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta.,* **1644**(2-3):83-94.
- Plenchette S, Moutet M, Benguella M, N'Gondara JP, Guigner F, Coffe C, Corcos L, Bettaieb A, and Solary E (2001). Early increase in DcR2 expression and late activation of caspases in the platelet storage lesion. *Leukemia,* **15**(10):1572-81.
- Poncet D, Larochette N, Pauleau AL, Boya P, Jalil AA, Cartron PF, Vallette F, Schnebelen C, Bartle LM, Skaletskaya A, Boutolleau D, Martinou JC, Goldmacher VS, Kroemer G, and Zamzami N (2004). An anti-apoptotic viral protein that recruits Bax to mitochondria. *J Biol Chem.,* **279**(21):22605-14. Epub 2004 Mar 5.
- Priault M, Cartron PF, Camougrand N, Antonsson B, Vallette FM, and Manon S (2003). Investigation of the role of the C-terminus of Bax and of tc-Bid on Bax interaction with yeast mitochondria. *Cell Death Differ.,* **10**(9):1068-77.
- Print CG, Loveland KL, Gibson L, Meehan T, Stylianou A, Wreford N, de Kretser D, Metcalf D, Kontgen F, Adams JM, and Cory S (1998). Apoptosis regulator bcl-w is essential for spermatogenesis but appears otherwise redundant. *Proc Natl Acad Sci U S A.,* **95**(21):12424-31.
- Putcha GV, Moulder KL, Golden JP, Bouillet P, Adams JA, Strasser A, and Johnson EM (2001). Induction of BIM, a proapoptotic BH3-only BCL-2 family member, is critical for neuronal apoptosis. *Neuron,* **29**(3):615-28.

- Puthalakath H, Huang DC, O'Reilly LA, King SM, and Strasser A (1999). The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell,* **3**(3):287-96.
- Puthalakath H, Villunger A, O'Reilly LA, Beaumont JG, Coultas L, Cheney RE, Huang DC, and Strasser A (2001). Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science,* **293**(5536):1829-32. Erratum in: *Science,* (2002) **297**(5584):1122. Comment in: *Science,* (2001) **293**(5536):1784-5.
- Puthalakath H, and Strasser A (2002). Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ.,* **9**(5):505-12. Review.

Q

- Qin ZH, Wang Y, Kikly KK, Sapp E, Kegel KB, Aronin N, and DiFiglia M (2001). Pro-caspase-8 is predominantly localized in mitochondria and released into cytoplasm upon apoptotic stimulation. *J Biol Chem.,* **276**(11):8079-86.
- Qiu XB, and Goldberg AL (2005). The membrane-associated inhibitor of apoptosis protein, BRUCE/Apollon, antagonizes both the precursor and mature forms of Smac and caspase-9. *J Biol Chem.,* **280**(1):174-82. Epub 2004 Oct 26.

R

- Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, and Perucho M (1997). Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science,* **275**(5302):967-9.
- Rao L, Perez D, and White E (1996). Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol.,* **135**(6 Pt 1):1441-55.
- Rapaport D (2005). How does the TOM complex mediate insertion of precursor proteins into the mitochondrial outer membrane? *J Cell Biol.,* **171**(3): 419–23.
- Rasper DM, Vaillancourt JP, Hadano S, Houtzager VM, Seiden I, Keen SL, Tawa P, Xanthoudakis S, Nasir J, Martindale D, Koop BF, Peterson EP, Thornberry NA, Huang J, MacPherson DP, Black SC, Hornung F, Lenardo MJ, Hayden MR, Roy S, and Nicholson DW (1998). Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex. *Cell Death Differ.,* **5**(4):271-88.
- Rathmell JC, and Thompson CB (2002). Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell,* **109**(Suppl): S97-107.
- Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, Maisse C, Daugas E, Zamzami N, Mak T, Jaattela M, Penninger JM, Garrido C, and Kroemer G (2001). Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol.,* **3**(9):839-43.
- Ravagnan L, Roumier T, and Kroemer G (2002). Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J Cell Physiol.,* **192**(2):131-7.
- Reed JC (1997). Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature,* **387**(6635):773-6.
- Reed JC (1998). Bcl-2 family proteins. *Oncogene,* **17**(25):3225-36.
- Reed JC (1999). Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol.,* **17**(9): 2941-53.
- Reed JC (2002). Apoptosis-based therapies. *Nat Rev Drug Discov.,* **1**(2):111-21.
- Reed JC (2003). Apoptosis-targeted therapies for cancer. *Cancer Cell,* **3**(1):17-22.

- Refaeli Y, Van Parijs L, London CA, Tschopp J, and Abbas AK (1998). Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. *Immunity,* **8**(5):615-23.
- Renatus M, Stennicke HR, Scott FL, Liddington RC, Salvesen GS (2001). Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proc Natl Acad Sci USA.,* **98**(25):14250-5.
- Ricci JE, Gottlieb RA, and Green DR (2003). Caspase-mediated loss of mitochondrial function and generation of reactive oxygen species during apoptosis. *J Cell Biol.,* **160**(1):65-75. Epub 2003 Jan 6.
- Ricci JE, Munoz-Pinedo C, Fitzgerald P, Bailly-Maitre B, Perkins GA, Yadava N, Scheffler IE, Ellisman MH, and Green DR (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**(6):773-86.
- Rice RL, Tang DG, and Taylor JD (1998). Actin cleavage in various tumor cells is not a critical requirement for executing apoptosis. *Pathol Oncol Res.,* **4**(2):135-45.
- Richardson H and Kumar S (2002). Death to flies: Drosophila as a model system to study programmed cell death. *J Immunol Methods,* **265**(1-2):21-38.
- Richter BW, Mir SS, Eiben LJ, Lewis J, Reffey SB, Frattini A, Tian L, Frank S, Youle RJ, Nelson DL, Notarangelo LD, Vezzoni P, Fearnhead HO and Duckett CS (2001). Molecular cloning of ILP-2, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family. *Mol Cell Biol,* **21**(13):4292–301.
- Riedl SJ, Renatus M, Schwarzenbacher R, Zhou Q, Sun C, Fesik SW, Liddington RC, and Salvesen GS (2001). Structural basis for the inhibition of Caspase-3 by XIAP. *Cell,* **104**(5):791-800.
- Rodriguez J, and Lazebnik Y (1999). Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev.,* **13**(24):3179-84.
- Rossé T, Olivier R, Monney L, Rager M, Conus S, Fellay I, Jansen B, and Borner C (1998). Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature,* **391**(6666):496-9. Comment in: Nature, **391**(6666):441-2.
- Rothe M, Pan MG, Henzel WJ, Ayres TM, and Goeddel DV (1995). The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell,* **83**(7):1243-52.
- Rotonda J, Nicholson DW, Fazil KM, Gallant M, Gareau Y, Labelle M, Peterson EP, Rasper DM, Ruel R, Vaillancourt JP, Thornberry NA, and Becker JW (1996). The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat Struct Biol.,* **3**(7):619-25.
- Roucou X, Montessuit S, Antonsson B, and Martinou JC (2002a). Bax oligomerization in mitochondrial membranes requires tBid (caspase-8-cleaved Bid) and a mitochondrial protein. *Biochem J.,* **368**(Pt 3):915-21.
- Roucou X, Rostovtseva T, Montessuit S, Martinou JC, and Antonsson B (2002b). Bid induces cytochrome c-impermeable Bax channels in liposomes. *Biochem J.,* **363**(Pt 3):547-52.
- Rousseau F, Schymkowitz JW, Wilkinson HR, and Itzhaki LS (2004). Intermediates control domain swapping during folding of p13suc1. *J Biol Chem.,* **279**(9):8368-77. Epub 2003 Dec 7.
- Roy N, Mahadevan MS, McLean M, Shutler G, Yaraghi Z, Farahani R, Baird S, Besner-Johnston A, Lefebvre C, Kang X, Salih M, Aubry H, Tamai K, Guan X, Ioannou P, Crawford TO, de Jong PJ, Surh L, Ikeda J-E, Korneluk RG, and MacKenzie A (1995). The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell,* **80**(1):167–78.

- Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, and Reed JC (1997). The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *Embo J.,* **16**(23):6914-25.
- Ruffolo SC, and Shore GC. BCL-2 selectively interacts with the BID-induced open conformer of BAK, inhibiting BAK auto-oligomerization. *J Biol Chem.,* **278**(27):25039-45. Epub 2003 Apr 29.
- Ruvolo PP, Deng X, Carr BK, and May WS (1998). A functional role for mitochondrial protein kinase Calpha in Bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis. *J Biol Chem.,* **273**(39):25436-42.

S

- Sadowski-Debbing K, Coy JF, Mier W, Hug H, and Los M (2002). Caspases: their role in apoptosis and other physiological processes as revealed by knock-out studies. *Arch Immunol Ther Exp.* (Warsz), **50**(1):19–34.
- Saeki K, Suzuki H, Tsuneoka M, Maeda M, Iwamoto R, Hasuwa H, Shida S, Takahashi T, Sakaguchi M, Endo T, Miura Y, Mekada E, and Mihara K (2000). Identification of Mammalian TOM22 as a Subunit of the Preprotein Translocase of the Mitochondrial Outer Membrane. *J Biol Chem.,* **275**:31996-32002.
- Saito M, Korsmeyer SJ, and Schlesinger PH (2000). BAX-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. *Nat Cell Biol.,* **2**(8):553-5.
- Salako MA, Carter MJ, and Kass GE (2006). Coxsackievirus Protein 2BC Blocks Host Cell Apoptosis by Inhibiting Caspase-3. *J Biol Chem.,* **281**(24):16296-304. Epub 2006 Apr 11.
- Salmena L, Lemmers B, Hakem A, Matysiak-Zablocki E, Murakami K, Au PY, Berry DM, Tamblyn L, Shehabeldin A, Migon E, Wakeham A, Bouchard D, Yeh WC, McGlade JC, Ohashi PS, and Hakem R (2003). Essential role for caspase 8 in T-cell homeostasis and T-cell-mediated immunity. *Genes Dev.,* **17**(7):883-95. Epub 2003 Mar 21.
- Salvesen GS, and Duckett CS (2002). IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol.,* **3**(6):401-10.
- Salvesen GS, and Dixit VM (1999). Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A.,* **96**(20):10964-7.
- Samali A, Cai J, Zhivotovsky B, Jones DP, and Orrenius S (1999). Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells. *Embo J.,* **18**(8):2040-8.
- Sambrook J, Fritsch E F, and Maniatis T (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Samejima K, Svingen PA, Basi GS, Kottke T, Mesner PW Jr, Stewart L, Durrieu F, Poirier GG, Alnemri ES, Champoux JJ, Kaufmann SH, and Earnshaw WC (1999). Caspase-mediated cleavage of DNA topoisomerase I at unconventional sites during apoptosis. *J Biol Chem.,* **274**(7):4335-40.
- Sansom MS, and Weinstein H (2000). Hinges, swivels and switches: the role of prolines in signalling via transmembrane alpha-helices. *Trends Pharmacol Sci.,* **21**(11):445-51. Review.
- Saraste A, and Pulkki K (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res.,* **45**(3):528-37.
- Sarid R, Sato T, Bohenzky RA, Russo JJ, and Chang Y (1997). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a functional Bcl-2 homologue. *Nature Med.,* **3**(3):293-8.
- Sartorius U, Schmitz I, and Krammer PH (2001). Molecular mechanism of death-receptor-mediated apoptosis. *Chembiochem.,* **2**(1):20-9.

- Sato T, Irie S, Kitada S, and Reed JC (1995). FAP-1: a protein tyrosine phosphatase that associates with Fas. *Science,* **268**(5209):411-5.
- Sattler M, Liang H, Nettesheim D, Meadows RP, Harlan JE, Eberstadt M, Yoon HS, Shuker SB, Chang BS, Minn AJ, Thompson CB, and Fesik SW (1997). Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science,* **275**(5302):983-6.
- Savill J, Fadok V, Henson P, and Haslett C (1993). Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today,* **14**(3):131-6.
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, and Peter ME (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J.,* **17**(6):1675-87.
- Scaffidi C, Schmitz I, Zha J, Korsmeyer SJ, Krammer PH, and Peter ME (1999). Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *J Biol Chem.,* **274**(32):22532-8.
- Scatena CD, Stewart ZA, Mays D, Tang LJ, Keefer CJ, Leach SD, and Pietenpol JA(1998). Mitotic phosphorylation of Bcl-2 during normal cell cycle progression and Taxol-induced growth arrest. *J Biol Chem.,* **273**(46):30777-84.
- Schafer P, Scholz SR, Gimadutdinow O, Cymerman IA, Bujnicki JM, Ruiz-Carrillo A, Pingoud A, and Meiss G (2004). Structural and functional characterization of mitochondrial EndoG, a sugar non-specific nuclease which plays an important role during apoptosis. *J Mol Biol.,* **338**(2):217-28.
- Schagger H, Cramer WA, and von Jagow G (1994). Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal Biochem.,* **217**(2):220-30.
- Schall TJ, Lewis M, Koller KJ, Lee A, Rice GC, Wong GH, Gatanaga T, Granger GA, Lentz R, Raab H, and *et al.* (1990). Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. *Cell,* **61**(2):361-70.
- Schendel SL, Xie Z, Montal MO, Matsuyama S, Montal M, and Reed JC (1997). Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.,* **94**(10):5113-8.
- Schendel SL, Montal M, and Reed JC (1998). Bcl-2 family proteins as ion-channels. *Cell Death Differ.,* **5**(5):372-80. Review.
- Schendel SL, Azimov R, Pawlowski K, Godzik A, Kagan BL, and Reed JC (1999). Ion channel activity of the BH3 only Bcl-2 family member, BID. *J Biol Chem.,* **274**(31):21932-6.
- Schinzel A, Kaufmann T, Schuler M, Martinalbo J, Grubb D, and Borner C (2004). Conformational control of Bax localization and apoptotic activity by Pro168. *J Cell Biol.,* **164**(7):1021-32. Epub 2004 Mar 22.
- Schlagbauer-Wadl H, Klosner G, Heere-Ress E, Waltering S, Moll I, Wolff K, Pehamberger H, and Jansen B (2000). Bcl-2 antisense oligonucleotides (G3139) inhibit Merkel cell carcinoma growth in SCID mice. *J Invest Dermatol.,* **114**(4):725-30.
- Schleiff E, Shore GC, and Goping IS (1997). Interactions of the human mitochondrial protein import receptor, hTom20, with precursor proteins in vitro reveal pleiotropic specificities and different receptor domain requirements. *J Biol Chem.,* **272**(28):17784-9.
- Schlesinger PH, Gross A, Yin XM, Yamamoto K, Saito M, Waksman G, and Korsmeyer SJ (1997). Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.,* **94**(21):11357-62.
- Schlesinger PH, and Saito M (2006). The Bax pore in liposomes, Biophysics. *Cell Death Differ.,* **13**(8):1403-8. Epub 2006 Jun 9. Review.
- Schlunegger MP, Bennett MJ, and Eisenberg D (1997). Oligomer formation by 3D domain swapping: a model for protein assembly and misassembly. *Adv Protein Chem.,* **50**:61-122.

- Schmitt E, Paquet C, Beauchemin M, Dever-Bertrand J, and Bertrand R (2000). Characterization of Bax-sigma, a cell death-inducing isoform of Bax. *Biochem Biophys Res Commun.,* **270**(3):868-79.
- Schmitt E, Paquet C, Beauchemin M, and Bertrand R (2004). Bcl-xES, a BH4- and BH2-containing antiapoptotic protein, delays Bax oligomer formation and binds Apaf-1, blocking procaspase-9 activation. *Oncogene,* **23**(22):3915-31.
- Schulze-Osthoff K, Walczak H, Droge W, and Krammer PH (1994). Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis. *J Cell Biol.,* **127**(1):15-20.
- Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, and Peter ME (1998). Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem.,* **254**(3):439-59. Review.
- Schwerk C, and Schulze-Osthoff K (2003). Non-apoptotic functions of caspases in cellular proliferation and differentiation. *Biochem Pharmacol.,* **66**(8):1453–8.
- Scorrano L, Ashiya M, Buttle K, Weiler S, Oakes SA, Mannella CA, and Korsmeyer SJ (2002). A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev Cell,* **2**(1):55-67.
- Scorrano L, and Korsmeyer SJ (2003). Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun.,* **304**(3):437-44. Review.
- Sedlak TW, Oltvai ZN, Yang E, Wang K, Boise LH, Thompson CB, and Korsmeyer SJ (1995). Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc Natl Acad Sci U S A.,* **92**(17):7834-8.
- Seol DW, and Billiar TR (1999). A caspase-9 variant missing the catalytic site is an endogenous inhibitor of apoptosis. *J Biol Chem.,* **274**(4):2072-6.
- Seol DW, Li J, Seol MH, Park SY, Talanian RV, and Billiar TR (2001). Signaling events triggered by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): caspase-8 is required for TRAIL-induced apoptosis. *Cancer Res.,* **61**(3):1138-43.
- Shangary S, and Johnson DE (2002). Peptides derived from BH3 domains of Bcl-2 family members: a comparative analysis of inhibition of Bcl-2, Bcl-x(L) and Bax oligomerization, induction of cytochrome c release, and activation of cell death. *Biochemistry,* **41**(30):9485-95.
- Sharpe JC, and London E (1999). Diphtheria toxin forms pores of different sizes depending on its concentration in membranes: probable relationship to oligomerization. *J Membr Biol.,* **171**(3):209-21.
- Shearwin-Whyatt LM, Harvey NL, and Kumar S (2000). Subcellular localization and CARD-dependent oligomerization of the death adaptator RAIDD. *Cell Death Differ.,* **7**(2):155-65.
- Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, Ramakrishnan L, Gray CL, Baker K, Wood WI, Goddard AD, Godowski P, and Ashkenazi A (1997). Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science,* **277**(5327):818-21.
- Shi B, Triebe D, Kajiji S, Iwata KK, Bruskin A, and Mahajna J (1999). Identification and characterization of baxepsilon, a novel bax variant missing the BH2 and the transmembrane domains. *Biochem Biophys Res Commun.,* **254**(3):779-85.
- Shi Y (2002). Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis. *Mol Cell.,* **9**(3):459–70. Review.
- Shimizu S, Ide T, Yanagida T, and 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**(16):12321-5.

- Shin S, Sung BJ, Cho YS, Kim HJ, Ha NC, Hwang JI, Chung CW, Jung YK, and Oh BH (2001). An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7. *Biochemistry,* **40**(4):1117–23.
- Shinjyo T, Kuribara R, Inukai T, Hosoi H, Kinoshita T, Miyajima A, Houghton PJ, Look AT, Ozawa K, and Inaba T (2001). Downregulation of Bim, a proapoptotic relative of Bcl-2, is a pivotal step in cytokine-initiated survival signaling in murine hematopoietic progenitors. *Mol Cell Biol.,* **21**(3):854-64.
- Shiozaki EN, Chai J, Rigotti DJ, Riedl SJ, Li P, Srinivasula SM, Alnemri ES, Fairman R, and Shi Y (2003). Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol Cell*, **11**(2):519-27.
- Shu HB, Takeuchi M and Goeddel DV (1996). The tumor necrosis factor receptor 2 signal transducers TRAF2 and c-IAP1 are components of the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex. *Proc Natl Acad Sci USA.,* **93**(24):13973–8.
- Shu HB, Halpin DR, and Goeddel DV (1997). Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis. *Immunity,* **6**(6):751-63.
- Simonen M, Keller H, and Heim J (1997). The BH3 domain of Bax is sufficient for interaction of Bax with itself and with other family members and it is required for induction of apoptosis. *Eur J Biochem.,* **249**(1):85-91.
- Simonian PL, Grillot DA, Andrews DW, Leber B, Nunez G (1996a). Bax homodimerization is not required for Bax to accelerate chemotherapy-induced cell death. *J Biol Chem.,* **271**(50):32073-7.
- Simonian PL, Grillot DA, Merino R, Nunez G (1996b). Bax can antagonize Bcl-XL during etoposide and cisplatin-induced cell death independently of its heterodimerization with Bcl-XL. *J Biol Chem.,* **271**(37):22764-72.
- Skulachev VP (2002). Programmed death in yeast as adaptation? *FEBS Lett.,* **528**(1-3):23-6.
- Sleath PR, Hendrickson RC, Kronheim SR, March CJ, and Black RA (1990). Substrate specificity of the protease that processes human interleukin-1 beta. *J Biol Chem.,* **265**(24):14526-8.
- Smith CA, Davis T, Anderson D, Solam L, Beckmann MP, Jerzy R, Dower SK, Cosman D, and Goodwin RG (1990). A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science,* **248**(4958):1019-23.
- Solomon M, Belenghi B, Delledonne M, Menachem E and Levine A (1999). The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *Plant Cell,* **11**(3):431-44.
- Song Q, Wei T, Lees-Miller S, Alnemri E, Watters D, and Lavin MF (1997). Resistance of actin to cleavage during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.,* **94**(1):157-62.
- Song Q, Kuang Y, Dixit VM, and Vincenz C (1999). Boo, a novel negative regulator of cell death, interacts with Apaf-1. *Embo J.,* **18**(1):167-78.
- Sordet O, Rebe C, Plenchette S, Zermati Y, Hermine O, Vainchenker W, Garrido C, Solary E, and Dubrez-Daloz L (2002). Specific involvement of caspases in the differentiation of monocytes into macrophages. *Blood,* **100**(13):4446-53. Epub 2002 Aug 8.
- Sorenson CM (2004). Bcl-2 family members and disease. *Biochim Biophys Acta,* **1644**(2-3):169-77. Review.
- Soucie EL, Annis MG, Sedivy J, Filmus J, Leber B, Andrews DW, and Penn LZ (2001). Myc potentiates apoptosis by stimulating Bax activity at the mitochondria. *Mol Cell Biol.,* **21**(14):4725-36.
- Spiess C, Beil A, and Ehrmann M (1999). A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell,* **97**(3):339-47.

- Squier MK, Miller AC, Malkinson AM, and Cohen JJ (1994). Calpain activation in apoptosis. *J Cell Physiol.,* **159**(2):229-37.
- Srinivasula SM, Ahmad M, Ottilie S, Bullrich F, Banks S, Wang Y, Fernandes-Alnemri T, Croce CM, Litwack G, Tomaselli KJ, Armstrong RC, and Alnemri ES (1997). FLAME-1, a novel FADD-like anti-apoptotic molecule that regulates Fas/TNFR1-induced apoptosis. *J Biol Chem.*, **272**(30):18542-5.
- Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, and Alnemri ES (1998). Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell,* **1**(7):949-57.
- Srinivasula SM, Ahmad M, Guo Y, Zhan Y, Lazebnik Y, Fernandes-Alnemri T, and Alnemri ES (1999). Identification of an endogenous dominant-negative short isoform of caspase-9 that can regulate apoptosis. *Cancer Res.* **59**(5):999-1002.
- Srinivasula SM, Hedge R, Saleh A, Datta P, Shiozaki E, Chai J, Lee RA, Robbins PD, Fernandes-Alnemri T, Shi Y, and Alnemri ES (2001a). A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates Caspase activity and apoptosis. *Nature,* **410**(6824):112-6. Erratum in: *Nature,* **411**(6841):1081. Comment in: *NIH Guide Grants Contracts,* NOT-OD-01-046 ; *NIH Guide Grants Contracts,* NOT-OD-01-040 ; *Nature,* **410**(6824):33-4.
- Srinivasula SM, Saleh A, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, and Alnemri ES (2001b). Isolation and assay of caspases. *Methods Cell Biol.,* **66**:1-27.
- Srinivasula SM, Poyet JL, Razmara M, Datta ML, Datta P, Zhang Z, and Alnemri ES (2002). The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for Caspase-1. *J Biol Chem.,* **277**(24):21119-22. Epub 2002 Apr 19.
- Stamenkovic I, Clark EA, and Seed B (1989). A B-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas. *Embo J.,* **8**(5):1403-10.
- Stanger BZ, Leder P, Lee TH, Kim E, and Seed B (1995). RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell,* **81**(4):513-23.
- Steere B, and Eisenberg D (2000). Characterization of high-order diphtheria toxin oligomers. *Biochemistry,* **39**(51):15901-9.
- Stennicke HR, Deveraux QL, Humke EW, Reed JC, Dixit VM, and Salvesen GS (1999). Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J Biol Chem.,* **274**(13):8359-62.
- Stoebner PE, Carayon P, Casellas P, Portier M, Lavabre-Bertrand T, Cuq P, Cano JP, Meynadier J, and Meunier L (2001). Transient protection by peripheral benzodiazepine receptors during the early events of ultraviolet light-induced apoptosis. *Cell Death Differ.,* **8**(7):747-53.
- Strack PR, Frey MW, Rizzo CJ, Cordova B, George HJ, Meade R, Ho SP, Corman J, Tritch R, and Korant BD (1996). Apoptosis mediated by HIV protease is preceded by cleavage of Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.,* **93**(18):9571-6.
- Strasser A, Whittingham S, Vaux DL, Bath ML, Adams JM, Cory S, and Harris AW (1991). Enforced BCL2 expression in B-lymphoid cells prolongs antibody responses and elicits autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.,* **88**(19):8661-5.
- Strasser A, Huang DC, Vaux DL (1997).The role of the bcl-2/ced-9 gene family in cancer and general implications of defects in cell death control for tumourigenesis and resistance to chemotherapy. *Biochim Biophys Acta,* **1333**(2):F151-78. Review.
- Strasser A, Puthalakath H, Bouillet P, Huang DC, O'Connor L, O'Reilly LA, Cullen L, Cory S, and Adams JM (2000). The role of bim, a proapoptotic BH3-only member of the Bcl-2 family in cell-death control. *Ann N Y Acad Sci.,* **917**:541-548. Review.

- Sugimoto C, Fujieda S, Seki M, Sunaga H, Fan GK, Tsuzuki H, Borner C, Saito H, and Matsukawa S (1999). Apoptosis-promoting gene (bax) transfer potentiates sensitivity of squamous cell carcinoma to cisplatin in vitro and in vivo. *Int J Cancer.,* **82**(6):860-7.
- Sundararajan R, Cuconati A, Nelson D, and White E (2001). Tumor necrosis factor-alpha induces Bax-Bak interaction and apoptosis, which is inhibited by adenovirus E1B 19K. *J Biol Chem.,* **276**(48):45120-7.
- Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A, Daugas E, Geuskens M, and Kroemer G (1996). Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of apoptogenic protease. *J Exp Med.,* **184**(4):1331-41.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Brenner C, Larochette N, Prevost MC, Alzari PM, and Kroemer G (1999a). Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med.* **189**(2):381-94.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, and Kroemer G (1999b). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature,* **397**(6718):441-6.Comment in: *Nature,* **397**(6718):387, 389.
- Suzuki M, Youle RJ, and Tjandra N (2000). Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell,* **103**(4):645-54.
- Suzuki Y, Nakabayashi Y, and Takahashi R (2001a). Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **98**(15):8662-7. Epub 2001 Jul 10.
- Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, and Takahashi R (2001b). A serine protease, HtrA2, is released from mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell,* **8**(3):613-21.
- Szallies A, Kubata BK, and Duszenko M (2002). A metacaspase of *Trypanosoma brucei* causes loss of respiration competence and clonal death in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.,* **517**(1-3):144-50.

T

- Takahashi R, Deveraux Q, Tamm I, Welsh K, Assa-Munt N, Salvesen GS, and Reed JC (1998). A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J Biol Chem.,* **273**(14):7787-90.
- Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T, and Reed JC (1998). IAP- family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res.,* **58**(23):5315-20.
- Tamura T, Ueda S, Yoshida M, Matsuzaki M, Mohri H, and Okubo T (1996). Interferon-gamma induces Ice gene expression and enhances cellular susceptibility to apoptosis in the U937 leukemia cell line. *Biochem Biophys Res Commun.,* **229**(1):21-6.
- Tan KO, Fu NY, Sukumaran SK, Chan SL, Kang JH, Poon KL, Chen BS, and Yu VC (2005). MAP-1 is a mitochondrial effector of Bax. *Proc Natl Acad Sci U S A.,* **102**(41):14623-8. Epub 2005 Sep 30.
- Tan YJ, Teng E, and Ting AE (2003). A small inhibitor of the interaction between Bax and Bcl-X(L) can synergize with methylprednisolone to induce apoptosis in Bcl-X(L)-overexpressing breast-cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol.,* **129**(8):437-48.
- Tanabe K, Kim R, Inoue H, Emi M, Uchida Y, and Toge T (2003). Antisense Bcl-2 and HER-2 oligonucleotide treatment of breast cancer cells enhances their sensitivity to anticancer drugs. *Int J Oncol.,* **22**(4):875-81.

- Tanaka S, Saito K, and Reed JC (1993). Structure-function analysis of the Bcl-2 oncoprotein. Addition of a heterologous transmembrane domain to portions of the Bcl-2 beta protein restores function as a regulator of cell survival. *J Biol Chem.,* **268**(15):10920-6.
- Tang G, Minemoto Y, Dibling B, Purcell NH, Li Z, Karin M, and Lin A (2001). Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes. *Nature,* **414**(6861):313-7.
- Tartaglia LA, Weber RF, Figari IS, Reynolds C, Palladino MA Jr, and Goeddel DV (1991). The two different receptors of tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.,* **88**(20):9292-6.
- Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, and Goeddel DV (1993). A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell,* **74**(5):845-53.
- Taylor JK, Zhang QQ, Wyatt JR, and Dean NM (1999). Induction of endogenous Bcl-xS through the control of Bcl-x pre-mRNA splicing by antisense oligonucleotides. *Nat Biotechnol.,* **17**(11):1097-100.
- Terrones O, Antonsson B, Yamaguchi H, Wang HG, Liu J, Lee RM, Herrmann A, and Basanez G (2004). Lipidic pore formation by the concerted action of proapoptotic BAX and tBID. *J Biol Chem.,* **279**(29):30081-91. Epub 2004 May 11.
- Thatte U, Bagadey S, and Dahanukar S (2000). Modulation of programmed cell death by medicinal plants. *Cell Mol Biol.* (Noisy-le-grand)*,* **46**(1):199-214.
- Thallinger C, Wolschek MF, Maierhofer H, Skvara H, Pehamberger H, Monia BP, Jansen B, Wacheck V, and Selzer E (2004). Mcl-1 is a novel therapeutic target for human sarcoma: synergistic inhibition of human sarcoma xenotransplants by a combination of mcl-1 antisense oligonucleotides with low-dose cyclophosphamide. *Clin Cancer Res.,* **10**(12 Pt 1):4185-91.
- Theodorakis P, Lomonosova E, and Chinnadurai G (2002). Critical requirement of BAX for manifestation of apoptosis induced by multiple stimuli in human epithelial cancer cells. *Cancer Res.,* **62**(12):3373-6.
- Thomas AL, Price C, Martin SG, Carmichael J, and Murray JC (1999). Identification of two novel mRNA splice variants of bax. *Cell Death Differ.,* **6**(2):97-8.
- Thome M, Schneider P, Hofmann K, Fickenscher H, Meinl E, Neipel F, Mattmann C, Burns K, Bodmer JL, Schroter M, Scaffidi C, Krammer PH, Peter ME, and Tschopp J (1997). Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature,* **386**(6624):517-21.
- Thome M, Hofmann K, Burns K, Martinon F, Bodmer JL, Mattmann C, and Tschopp J (1998). Identification of CARDIAK, a RIP-like kinase that associates with caspase-1. *Curr Biol.,* **8**(15):885-8.
- Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J, and *et al.* (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature,* **356**(6372):768-74.
- Thornberry NA, and Lazebnik Y (1998). Caspases: enemies within. *Science*, **281**(5381):1312-6.
- Tiranti V, Rossi E, Ruiz-Carrillo A, Rossi G, Rocchi M, DiDonato S, Zuffardi O, and Zeviani M (1995). Chromosomal localization of mitochondrial transcription factor A (TCF6), single-stranded DNA-binding protein (SSBP), and endonuclease G (ENDOG), three human housekeeping genes involved in mitochondrial biogenesis. *Genomics,* **25**(2):559-64.
- Tittel JN, and Steller H (2000). A comparison of programmed cell death between species. *Genome Biol.,* **1**(3):REVIEWS0003.
- Torii S, Egan DA, Evans RA, and Reed JC (1999). Human Daxx regulates Fas-induced apoptosis from nuclear PML oncogenic domains (PODs). *Embo J.,* **18**(21):6037-49.

- Tremblais K, Oliver L, Juin P, Le Cabellec TM, Meflah K, and Vallette FM (1999). The C-terminus of bax is not a membrane addressing/anchoring signal. *Biochem Biophys Res Commun.,* **260**(3):582-91.
- Truscott KN, Brandner K, and Pfanner N (2003). Mechanisms of Protein Import into Mitochondria. *Curr Biol.,* **13**:R326-R337.
- Tschopp J, Irmler M, and Thome M (1998). Inhibition of fas death signals by FLIPs. *Curr Opin Immunol.,* **10**(5):552-8.
- Tschopp J, Martinou F, and Hofmann K (1999). Apoptosis: Silencing the death receptors. *Curr Biol*., **9**(10):R381-4.
- Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, and Croce CM (1984). Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science,* **226**(4678):1097-9.
- Tsujimoto Y, and Croce CM (1986). Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA*., **83**(14):5214-8.
- Tzung SP, Kim KM, Basanez G, Giedt CD, Simon J, Zimmerberg J, Zhang KY, and Hockenbery DM (2001). Antimycin A mimics a cell-death-inducing Bcl-2 homology domain 3. *Nat Cell Biol.,* **3**(2):183-91.

U

- Uren AG, Pakusch M, Hawkins CJ, Puls KL, and Vaux DL (1996). Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.,* **93**(10):4974-8.
- Uren AG, O'Rourke K, Aravind LA, Pisabarro MT, Seshagiri S, Koonin EV, and Dixit VM (2000). Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol Cell,* **6**(4):961-7.

V

- van der Goot FG, Ausio J, Wong KR, Pattus F, and Buckley JT (1993). Dimerization stabilizes the pore-forming toxin aerolysin in solution. *J Biol Chem.,* **268**(24):18272-9.
- Vander Heiden MG, Chandel NS, Williamson EK, Schumacker PT, and Thompson CB (1997). Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell,* **91**(5):627-37. Comment in: *Cell,* **91**(5):559-62.
- Vander Heiden MG, Li XX, Gottleib E, Hill RB, Thompson CB, and Colombini M (2001). Bcl-xL promotes the open configuration of the voltage-dependent anion channel and metabolite passage through the outer mitochondrial membrane. *J Biol Chem.,* **276**(22):19414-9. Epub 2001 Mar 20.
- Vander Heiden MG, Chandel NS, Li XX, Schumacker PT, Colombini M, and Thompson CB (2000). Outer mitochondrial membrane permeability can regulate coupled respiration and cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.,* **97**(9):4666-71.
- van Gurp M, Festjens N, van Loo G, Saelens X, and Vandenabeele P (2003). Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem Biophys Res Commun.,* **304**(3):487-97.
- 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, and Vandenabeele P (2001).

Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Differ.,* **8**(12):1136-42.

- van Loo G, Demol H, van Gurp M, Hoorelbeke B, Schotte P, Beyaert R, Zhivotovsky B, Gevaert K, Declercq W, Vandekerckhove J, and Vandenabeele P (2002a). 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**(3):301-8.
- van Loo G, Saelens X, Matthijssens F, Schotte P, Beyaert R, Declercq W, and Vandenabeele P (2002b). Caspases are not localized in mitochondria during life or death. *Cell Death Differ.,* **9**(11):1207-11.
- van Wilpe S RMT, Hill K, Maarse AC, Meisinger C, Brix J, Dekker PJT, Mockzo M, Wagner R, Meijer M, Guiard B, Hölinger A, and Pfanner N (1999). Tom22 is a multifunctional organizer of the mitochondrial preprotein translocase. *Nature,* **401**:485-9.
- Varfolomeev EE, Schuchmann M, Luria V, Chiannilkulchai N, Beckmann JS, Mett IL, Rebrikov D, Brodianski VM, Kemper OC, Kollet O, Lapidot T, Soffer D, Sobe T, Avraham KB, Goncharov T, Holtmann H, Lonai P, and Wallach D (1998). Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity,* **9**(2):267-76.
- Vaux DL, Cory S, and Adams JM (1988). Bcl-2 gene promotes hematopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature,* **355**(6189):440-2.
- Vaux DL, and Korsmeyer SJ (1999). Cell death in development. *Cell,* **96**(2):245-54.
- Vaux DL (2002). Apoptosis Timeline. *Cell Death Differ.,* **9**(4):349-54.
- Veis DJ, Sorenson CM, Shutter JR, and Korsmeyer SJ (1993). Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell,* **75**(2):229-40.
- Verhage M, Maia AS, Plomp JJ, Brussaard AB, Heeroma JH, Vermeer H, Toonen RF, Hammer RE, van den Berg TK, Missler M, Geuze HJ, and Südhof TC (2000). Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotranmitter secretion. *Science*, **287**(5454):864-9.
- Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, and Vaux DL (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell,* **102**(1):43-53.
- Verhagen AM, Silke J, Ekert PG, Pakusch M, Kaufmann H, Connolly LM, Day CL, Tikoo A, Burke R, Wrobel C, Moritz RL, Simpson RJ, and Vaux DL (2002). HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem.,* **277**(1):445-54. Epub 2001 Oct 16.
- Viardot A, Barth TF, Moller P, Dohner H, and Bentz M (2003). Cytogenetic evolution of follicular lymphoma. *Semin Cancer Biol.,* **13**(3):183-90. Review.
- Vieira HL, Boya P, Cohen I, El Hamel C, Haouzi D, Druillenec S, Belzacq AS, Brenner C, Roques B, and Kroemer G (2002). Cell permeable BH3-peptides overcome the cytoprotective effect of Bcl-2 and Bcl-X(L). *Oncogene,* **21**(13):1963-77.
- Villa PG, Henzel WJ, Sensenbrenner M, Henderson CE, and Pettmann B (1998). Calpain inhibitors, but not caspase inhibitors, prevent actin proteolysis and DNA fragmentation during apoptosis. *J Cell Sci.,* **111**(Pt 6):713-22.
- Vincenz C, and Dixit VM (1997). Fas-associated death domain protein interleukin-1beta-converting enzyme 2 (FLICE2), an ICE/Ced-3 homologue, is proximally involved in CD95- and p55-mediated death signaling. *J Biol Chem.,* **272**(10):6578-83.
- Vogelstein B, Lane D, and Levine AJ (2000). Surfing the p53 network. *Nature,* **408**(6810):307-10.

- Vogt C (1842). Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (Alytes obstetricans). Solothum: Jent und Gassmann, pp 130.
- von Ahsen O, Renken C, Perkins G, Kluck RM, Bossy-Wetzel E, and Newmeyer DD (2000a). Preservation of mitochondrial structure and function after Bid- or Bax-mediated cytochrome c release. *J Cell Biol.,* **150**(5):1027-36.
- von Ahsen O, Waterhouse NJ, Kuwana T, Newmeyer DD, and Green DR (2000b). The 'harmless' release of cytochrome c. *Cell Death Differ.,* **7**(12):1192–9.
- von Freeden-Jeffry U, Solvason N, Howard M, and Murray R (1997). The earliest T lineage-committed cells depend on IL-7 for Bcl-2 expression and normal cell cycle progression. *Immunity,* **7**(1):147-54.
- Vousden KH, and Lu X (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer,* **2**(8):594-604.
- Vucic D, Kaiser WJ, and Miller LK (1998). Inhibitor of apoptosis proteins physically interact with and block apoptosis induced by Drosophila proteins HID and GRIM. *Mol Cell Biol.,* **18**(6):3300-9.
- Vucic D, Stennicke HR, Pisabarro MT, Salvesen GS and Dixit VM (2000). ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas. *Curr Biol.,* **10**(21):1359–66.
- Vyas S, Javoy-Agid F, Herrero MT, Strada O, Boissiere F, Hibner U, and Agid Y (1997). Expression of Bcl-2 in adult human brain regions with special reference to neurodegenerative disorders. *J Neurochem.,* **69**(1):223-31.

W

- Wajant H (2002). The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science,* **296**(5573):1635-6.
- Walker NP, Talanian RV, Brady KD, Dang LC, Bump NJ, Ferenz CR, Franklin S, Ghayur T, Hackett MC, Hammill LD, and *et al.* (1994). Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)2 homodimer. *Cell,* **78**(2):343-52.
- Walker PR, and Sikorska M (1994). Endonucleases activities, chromatin structure, and DNA degradation in apoptosis. *Biochem Cell Biol.,* **72**(11-12):615-23. Review.
- Walter J, Schindzielorz A, Grunberg J, and Haass C (1999). Phosphorylation of presenilin-2 regulates its cleavage by caspases and retards progression of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA.,* **96**(4):1391-6.
- Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, and Baldwin AS Jr (1998). NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science,* **281**(5383):1680-3.
- Wang J, Chun HJ, Wong W, Spencer DM, and Lenardo MJ (2001). Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.,* **98**(24):13884-8.
- Wang JL, Liu D, Zhang ZJ, Shan S, Han X, Srinivasula SM, Croce CM, Alnemri ES, and Huang Z (2000a). Structure-based discovery of an organic compound that binds Bcl-2 protein and induces apoptosis of tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.,* **97**(13):7124-9.
- Wang JL, Zhang ZJ, Choksi S, Shan S, Lu Z, Croce CM, Alnemri ES, Korngold R, and Huang Z (2000b). Cell permeable Bcl-2 binding peptides: a chemical approach to apoptosis induction in tumor cells. *Cancer Res.,* **60**(6):1498-502.
- Wang K, Yin XM, Chao DT, Milliman CL, and Korsmeyer SJ (1996). BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev.,* **10**(22):2859-69.

- Wang K, Gross A, Waksman G, and Korsmeyer SJ (1998). Mutagenesis of the BH3 domain of BAX identifies residues critical for dimerization and killing. *Mol Cell Biol.,* **18**(10):6083-9.
- Wang L, Miura M, Bergeron L, Zhu H, and Yuan J (1994). Ich-1, an Ice/ced-3-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. *Cell,* **78**(5):739-50.
- Wang S, Miura M, Jung YK, Zhu H, Li E, and Yuan J (1998). Murine caspase-11, an ICE-interacting protease, is essential for the activation of ICE. *Cell,* **92**(4):501-9.
- Wang X (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.,* **15**(22):2922-33.
- Wang X, Yang C, Chai J, Shi Y, and Xue D (2002). Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in Caenorhabditis elegans. *Science,* **298**(5598):1587-92.
- Wang XW (1999). Role of p53 and apoptosis in carcinogenesis. *Anticancer Res.,* **19**(6A):4759-71.
- Waterhouse NJ, Goldstein JC, von Ahsen O, Schuler M, Newmeyer DD, and Green DR (2001). Cytochrome c maintains mitochondrial transmembrane potential and ATP generation after outer mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process. *J Cell Biol.,* **153**(2):319-28.
- Waters JS, Webb A, Cunningham D, Clarke PA, Raynaud F, di Stefano F, and Cotter FE (2000). Phase I clinical and pharmacokinetic study of bcl-2 antisense oligonucleotide therapy in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol.,* **18**(9):1812-23.
- Watson ML, Rao JK, Gilkeson GS, Ruiz P, Eicher EM, Pisetsky DS, Matsuzawa A, Rochelle JM, and Seldin MF (1992). Genetic analysis of MRL-lpr mice: relationship of the Fas apoptosis gene to disease manifestations and renal disease-modifying loci. *J Exp Med.,* **176**(6):1645-56.
- Watt W, Koeplinger KA, Mildner AM, Heinrikson RL, Tomasselli AG, and Watenpaugh KD (1999). The atomic-resolution structure of human caspase-8, a key activator of apoptosis. *Structure Fold Des.,* **7**(9):1135-43.
- Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, and Korsmeyer SJ (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science,* **292**(5517):727-30.
- Wei Y, Fox T, Chambers SP, Sintchak J, Coll JT, Golec JM, Swenson L, Wilson KP, and Charifson PS (2000). The structure of caspases-1, -3, -7 and -8 reveal the basis for substrate and inhibitor selectivity. *Chem Biol.,* **7**(6):423-32.
- Weil M, Jacobson MD, Coles HS, Davies TJ, Gardner RL, Raff KD, and Raff MC (1996). Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. *J Cell Biol.,* **133**(5):1053-9.
- Welihinda AA, Tirasophon W, and Kaufman RJ (1999). The cellular response to protein misfolding in the endoplasmic reticulum. *Gene Expr.,* **7**(4-6):293-300. Review.
- White E (1996). Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev.,* **10**(1):1-15.
- Whitfield J, Neame SJ, Paquet L, Bernard O, and Ham J (2001). Dominant-negative c-Jun promotes neuronal survival by reducing BIM expression and inhibiting mitochondrial cytochrome c release. *Neuron,* **29**(3):629-43.
- Widlak P, Li LY, Wang X, and Garrard WT (2001). Action of recombinant human apoptotic endonuclease G on naked DNA and chromatin substrates: cooperation with exonuclease and DNase I. *J Biol Chem.,* **276**(51):48404-9.
- Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA, and *et al.* (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity,* **3**(6):673-82.

- Wilkinson JC, Cepero E, Boise LH, and Duckett CS (2004). Upstream regulatory role for XIAP in receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol.,* **24**(16):7003-14.
- Williams JR, Little JB, and Shipley WU (1974). Association of mammalian cell death with a specific endonucleolytic degradation of DNA. *Nature,* **252**(5485):754-5.
- Wilson-Annan J, O'Reilly LA, Crawford SA, Hausmann G, Beaumont JG, Parma LP, Chen L, Lackmann M, Lithgow T, Hinds MG, Day CL, Adams JM, and Huang DC (2003). Proapoptotic BH3-only proteins trigger membrane integration of prosurvival Bcl-w and neutralize its activity. *J Cell Biol.,* **162**(5):877-87.
- Wilson KP, Black JA, Thomson JA, Kim EE, Griffith JP, Navia MA, Murcko MA, Chambers SP, Aldape RA, Raybuck SA, and *et al.* (1994). Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature,* **370**(6487):270-5. Comment in: *Nature,* **370**(6487):251-2.
- Winyard PJ, Nauta J, Lirenman DS, Hardman P, Sams VR, Risdon RA, and Woolf AS (1996a). Deregulation of cell survival in cystic and dysplastic renal development. *Kidney Int.,* **49**(1):135-46.
- Winyard PJ, Risdon RA, Sams VR, Dressler GR, and Woolf AS (1996b). The PAX2 tanscription factor is expressed in cystic and hyperproliferative dysplastic epithelia in human kidney malformations. *J Clin Invest.,* **98**(2):451-9.
- Wolf BB, and Green DR (2002). Apoptosis: letting slip the dogs of war. *Curr Biol.,* **12**(5):R177-9. Review.
- Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, and Youle RJ (1997). Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol.,* **139**(5):1281-92.
- Woo M, Hakem R, Soengas MS, Duncan GS, Shahinian A, Kagi D, Hakem A, McCurrach M, Khoo W, Kaufman SA, Senaldi G, Howard T, Lowe SW, and Mak TW (1998). Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev.,* **12**(6):806-19.
- Wood DE, Thomas A, Devi LA, Berman Y, Beavis RC, Reed JC, and Newcomb EW (1998). Bax cleavage is mediated by calpain during drug-induced apoptosis. *Oncogene,* **17**(9):1069-78.
- Wu G, Chai J, Suber TL, Wu JW, Du C, Wang X, and Shi Y (2000). Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature,* **408**(6815):1008-12.
- Wu Y, Mehew JW, Heckman CA, Arcinas M and Boxer LM (2001). Negative regulation of bcl-2 expression by p53 in hematopoietic cells. *Oncogene,* **20**(2):240-51.
- Wyllie AH (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature,* **284**(5756):555-6.
- Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, and Dunlop D (1984). Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol.,* **142**(1):67-77.

X

- Xanthoudakis S, Roy S, Rasper D, Hennessey T, Aubin Y, Cassady R, Tawa P, Ruel R, Rosen A, and Nicholson DW (1999). Hsp60 accelerates the maturation of pro-caspase-3 by upstream activator proteases during apoptosis. *Embo J.,* **18**(8):2049-56.
- Xiang J, Chao DT, and Korsmeyer SJ (1996). BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A.,* **93**(25):14559-63.
- Xin M, and Deng X (2005). Nicotine inactivation of the proapoptotic function of Bax through phosphorylation. *J Biol Chem.,* **280**(11):10781-9. Epub 2005 Jan 10.

- Xu D, Tsai CJ, and Nussinov R (1998). Mechanism and evolution of protein dimerization. *Protein Sci.,* **7**(3):533-44.
- Xu Q, and Reed JC (1998). Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast. *Mol Cell,* **1**(3):337-46.

Y

- Yakovlev AG, Knoblach SM, Fan L, Fox GB, Goodnight R, and Faden AI (1997). Activation of CPP32-like caspases contributes to neuronal apoptosis and neurological dysfunction after traumatic brain injury. *J Neurosci.,* **17**(19):7415-24.
- Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, and Korsmeyer SJ (1995). Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell,* **80**(2):285-91.
- Yang E, and Korsmeyer SJ (1996). Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood,* **88**(2):386-401.
- Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, and Wang X (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science,* **275**(5303):1129-32. Comment in: *Science,* **275**(5303):1081-2.
- Yang X, Merchant MS, Romero ME, Tsokos M, Wexler LH, Kontny U, Mackall CL, and Thiele CJ (2003). Induction of caspase 8 by interferon gamma renders some neuroblastoma (NB) cells sensitive to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) but reveals that a lack of membrane-bound TR1/TR2 also contributes to TRAIL resistance in NB. *Cancer Res.,* **63**(5):1122-9.
- Yang Y, Fang S, Jensen JP, Weissman AM, Ashwell JD (2000). Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science,* **288**(5467):874–7.
- Yasuda M, Theodorakis P, Subramanian T, and Chinnadurai G (1998). Adenovirus E1B-19K/BCL-2 interacting protein BNIP3 contains a BH3 domain and a mitochondrial targeting sequence. *J Biol Chem.,* **273**(20):12415-21.
- Yasuda M, Han JW, Dionne CA, Boyd JM, and Chinnadurai G (1999). BNIP3alpha: a human homolog of mitochondrial proapoptotic protein BNIP3. *Cancer Res.,* **59**(3):533-7.
- Yeh WC, Pompa JL, McCurrach ME, Shu HB, Elia AJ, Shahinian A, Ng M, Wakeham A, Khoo W, Mitchell K, El-Deiry WS, Lowe SW, Goeddel DV, and Mak TW (1998). FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science,* **279**(5358):1954-8.
- Yethon JA, Epand RF, Leber B, Epand RM, and Andrews DW (2003). Interaction with a membrane surface triggers a reversible conformational change in Bax normally associated with induction of apoptosis. *J Biol Chem.,* **278**(49):48935-41. Epub 2003 Sep 30.
- Yin C, Knudson CM, Korsmeyer SJ, and Van Dyke T (1997). Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo. *Nature,* **385**(6617):637-40.
- Yin XM, Oltvai ZN, and Korsmeyer SJ (1994). BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature,* **369**(6478):321-3.
- Yin XM, Wang K, Gross A, Zhao Y, Zinkel S, Klocke B, Roth KA, and Korsmeyer SJ (1999). Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature,* **400**(6747):886-91.
- Yonehara S, Ishii A, and Yonehara M (1989). A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med.,* **169**(5):1747-56.

- Yoshida H, Kong YY, Yoshida R, Elia AJ, Hakem A, Hakem R, Penninger JM, and Mak TW (1998). Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell,* **94**(6):739-50.
- Yu J, Zhang L, Hwang PM, Kinzler KW, and Vogelstein B (2001). PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell,* **7**(3):673-82.
- Yuan J, and Horvitz HR (1992). The *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-4* encodes a novel protein and is expressed during the period of extensive programmed cell death. *Development,* **116**(2):309-20.
- Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, and Horvitz HR (1993). The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell,* **75**(4):641-52.

Z

- Zakeri Z, and Lockshin RA (2002). Cell death during development. *J Immunol Methods,* **265**(1-2):3-20. Review.
- Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Hirsch T, Susin SA, Masse B, and Kroemer G (1996). Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis. *FEBS Lett.,* **384**(1):53-7.
- Zamzami N, and Kroemer G (2001). The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol.,* **2**(1):67-71. Review.
- Zamzami N, Larochette N, and Kroemer G (2005). Mitochondrial permeability transition in apoptosis and necrosis. *Cell Death Differ.,* 12 **Suppl 2**:1478-80.
- Zermati Y, Garrido C, Amsellem S, Fishelson S, Bouscary D, Valensi F, Varet B, Solary E, and Hermine O (2001). Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J Exp Med.,* **193**(2):247-54.
- Zha H, Aime-Sempe C, Sato T, and Reed JC (1996a). Proapoptotic protein Bax heterodimerizes with Bcl-2 and homodimerizes with Bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2. *J Biol Chem.,* **271**(13):7440-4.
- Zha H, Fisk HA, Yaffe MP, Mahajan N, Herman B, and Reed JC (1996b). Structure-function comparisons of the proapoptotic protein Bax in yeast and mammalian cells. *Mol Cell Biol.,* **16**(11):6494-508.
- Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, and Korsmeyer SJ (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell,* **87**(4):619-28. Comment in: *Cell,* **87**(4):589-92.
- Zha J, Harada H, Osipov K, Jockel J, Waksman G, and Korsmeyer SJ (1997). BH3 domain of BAD is required for heterodimerization with BCL-XL and pro-apoptotic activity. *J Biol Chem.,* **272**(39):24101-4.
- Zhang H, Xu Q, Krajewski S, Krajewska M, Xie Z, Fuess S, Kitada S, Pawlowski K, Godzik A, and Reed JC (2000). BAR: An apoptosis regulator at the intersection of caspases and Bcl-2 family proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.,* **97**(6):2597-602.
- Zhang H, Holzgreve W, and De Geyter C (2001). Bcl2-L-10, a novel anti-apoptotic member of the Bcl-2 family, blocks apoptosis in the mitochondria death pathway but not in the death receptor pathway. *Hum Mol Genet.,* **10**(21):2329-39.
- Zhang J, Cado D, Chen A, Kabra NH, and Winoto A (1998). Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature,* **392**(6673):296-300.
- Zhang L, Yu J, Park BH, Kinzler KW, and Vogelstein B (2000). Role of BAX in the apoptotic response to anticancer agents. *Science,* **290**(5493):989-92.

- Zhang X, Brunner T, Carter L, Dutton RW, Rogers P, Bradley L, Sato T, Reed JC, Green D, and Swain SL (1997). Unequal death in T helper cell (Th)1 and Th2 effectors: Th1, but not Th2, effectors undergo rapid Fas/FasL-mediated apoptosis. *J Exp Med.,* **185**(10):1837-49.
- Zhang Z, Lapolla SM, Annis MG, Truscott M, Roberts GJ, Miao Y, Shao Y, Tan C, Peng J, Johnson AE, Zhang XC, Andrews DW, and Lin J (2004). Bcl-2 homodimerization involves two distinct binding surfaces, a topographic arrangement that provides an effective mechanism for Bcl-2 to capture activated Bax. *J Biol Chem.,* 279(42):43920-8. Epub 2004 Aug 9.
- Zheng TS, Schlosser SF, Dao T, Hingorani R, Crispe IN, Boyer JL, and Flavell RA (1998). Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.,* **95**(23):13618-23.
- Zheng TS, Hunot S, Kuida K, and Flavell RA (1999). Caspase knockouts: matters of life and death. *Cell Death Differ.,* **6**(11):1043-53. Review.
- Zheng TS (2001). Death by design: the big debut of small molecules. *Nat Cell Biol.,* **3**(2):E43-6.
- Zhivotovsky B, Orrenius S, Brustugun OT, and Doskeland SO (1998). Injected cytochrome c induces apoptosis. *Nature,* **391**(6666):449-50.
- Zhou M, Demo SD, McClure TN, Crea R, and Bitler CM (1998). A novel splice variant of the cell death-promoting protein BAX. *J Biol Chem.,* **273**(19):11930-6.
- Zhou P, Qian L, Kozopas KM, and Craig RW (1997). Mcl-1, a Bcl-2 family member, delays the death of hematopoietic cells under a variety of apoptosis-inducing conditions. *Blood,* **89**(2):630-43.
- Zhou Q, and Salvesen GS (1997). Activation of pro-caspase-7 by serine proteases includes a non-canonical specificity. *Biochem J.,* **324**(Pt 2):361-4.
- Zhou Q, Snipas S, Orth K, Muzio M, Dixit VM, and Salvesen GS (1997). Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases. *J Biol Chem.,* **272**(12):7797-800.
- Zhou Q, Krebs JF, Snipas SJ, Price A, Alnemri ES, Tomaselli KJ, and Salvesen GS (1998). Interaction of the baculovirus anti-apoptotic protein p35 with caspases. Specificity, kinetics, and characterization of the caspase/p35 complex. *Biochemistry,* **37**(30):10757-65.
- Zimmermann KC, Bonzon C, and Green DR (2001). The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther.*, **92**(1):57-70.
- Zong WX, Edelstein LC, Chen C, Bash J, and Gelinas C (1999). The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis. *Genes Dev.,* **13**(4):382-7.
- Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, and Wang X (1997). Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell,* **90**(3):405-13. Comment in: *Cell,* **90**(3):389-90.
- Zou H, Li Y, Liu X, and Wang X (1999). An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem.,* **274**(17):11549-56.
- Zuzak TJ, Steinhoff DF, Sutton LN, Phillips PC, Eggert A, and Grotzer MA (2002). Loss of caspase-8 mRNA expression is common in childhood primitive neuroectodermal brain tumour/medulloblastoma. *Eur J Cancer.,* **38**(1):83-91.
- Zuzarte-Luis V, and Hurle JM (2002). Programmed cell death in the developing limb. *Int J Dev Biol.,* **46**(7):871-6.

RESUME

Implication de l'extrémité C-terminale de Bax dans son homo-oligomérisation au cours de l'apoptose.

La protéine pro-apoptotique Bax joue un rôle crucial dans le déclenchement de l'apoptose, une forme de mort cellulaire génétiquement programmée essentielle au bon développement embryonnaire et à l'homéostasie cellulaire chez l'adulte. Suite à un stimulus apoptotique, Bax subit des changements conformationnels, permettant son adressage et son insertion à la membrane mitochondriale externe. L'oligomérisation de Bax est nécessaire à son activité apoptogène. Le sujet de ma thèse a été l'analyse du rôle de l'extrémité C-terminale de Bax. Les données présentées montrent que le C-terminal n'est pas un signal d'adressage mitochondrial. Il est impliqué dans le processus d'oligomérisation, mais n'est pas un domaine de dimérisation. Il n'est pas essentiel à l'activité apoptotique de Bax. En outre, les données présentées suggèrent que TOM22 est un récepteur mitochondrial de Bax. Ce travail contribue à préciser le mécanisme d'action de Bax au cours de l'apoptose.

Mots clés : apoptose, Bax, conformation, activation, adressage, récepteur, mitochondrie, insertion, oligomérisation.

C-terminus of Bax is involved in its homo-oligomerization during apoptosis.

The pro-apoptotic protein Bax plays a crucial role in triggering apoptosis, a genetic cell death program that is essential for the development and maintenance of cellular homeostasis in adult. After an apoptotic stimulus, Bax undergoes conformational changes that allow its addressing to mitochondria and insertion into the outer mitochondrial membrane. Oligomerization of Bax is essential for its apoptogenic activity. The aim of my thesis was the analysis of the role of the C-terminus in the function of Bax. The data presented show that the C-terminus of Bax is not a mitochondrial addressing domain. It is involved in the oligomerization process, however it is not the dimerization domain. Moreover, it is not necessary for the apoptotic activity of Bax. Furthermore, presented data suggest that TOM22 is a mitochondrial receptor of Bax. This work contributes to the understanding of the mechanism of action of Bax during apoptosis.

Key words: apoptosis, Bax, conformation, activation, addressing, receptor, mitochondria, insertion, oligomerization.