



HAL
open science

GALIG : UN NOUVEAU GÈNE HUMAIN INDUCTEUR DE LA MORT CELLULAIRE

Mélanie Duneau

► **To cite this version:**

Mélanie Duneau. GALIG : UN NOUVEAU GÈNE HUMAIN INDUCTEUR DE LA MORT CELLULAIRE. domain_other. Université d'Orléans, 2005. Français. NNT : . tel-00010769

HAL Id: tel-00010769

<https://theses.hal.science/tel-00010769>

Submitted on 26 Oct 2005

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Thèse

présentée à

L'Université d'Orléans

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université d'Orléans

Biologie et Biophysique Moléculaires et Cellulaires

Par

Mélanie DUNEAU

***Galig* : un nouveau gène humain
inducteur de la mort cellulaire.**

Soutenue le 2005

Membres du Jury :

- | | |
|-------------------------------|--|
| -M. Christian-Jacques LARSEN, | Rapporteur/Université de Poitiers |
| -M. François VALLETTE, | Rapporteur/INSERM |
| -M. Jérôme DELON, | Examineur/CNRS |
| -M. Francis DELMOTTE | Examineur/Université d'Orléans |
| -M. Alain LEGRAND, | Directeur de thèse/Université d'Orléans. |

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	2
ABREVIATIONS	6
INTRODUCTION	8
GENERALITES	10
I. La mort cellulaire programmée : un concept récent.	11
II. Pourquoi contrôler la mort cellulaire ?	15
III. La mort cellulaire : une question de formes...	18
IV. Quelques acteurs moléculaires de la MCP.	25
1. Les protéines de la famille Bcl-2 : le ying et le yang de la MCP.	26
1.1. Caractéristiques structurales.	26
1.2. Modes d'action des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2.	28
1.3. Régulation de l'activité des protéines de la famille Bcl-2.	34
2. La libération extra-mitochondriale de facteurs pro-apoptotiques : armes fatales !	39
2.1. Cytochrome <i>c</i> .	39
2.2. AIF.	40
2.3. Endonucléase G.	40
2.4. Smac/DIABLO.	41
2.5. HtrA2/Omi.	41
2.6. ROS.	42
3. Les caspases : la cascade de la mort !	43
3.1. Structure des caspases.	43
3.2. Modes d'activation des caspases.	44
3.3. Les substrats des caspases.	49
3.4. Les inhibiteurs des caspases: antidotes de la mort !	52
3.5. Une voie de MCP indépendante des caspases.	55
4. Le calcium : un autre agent double !	60
4.1. Causes d'une augmentation de $[Ca^{2+}]_c$ dans la MCP.	60
4.2. Conséquences d'une augmentation de $[Ca^{2+}]_c$ dans la MCP.	60
5. Phosphatidylsérine : mangez moi !	62
V. Mort cellulaire et pathologies.	63
1. Le cancer.	64
1.1. Cancer et apoptose.	64
1.2. Cancer et autophagie cellulaire.	67
2. Le SIDA.	68

3. Les maladies dégénératives. _____ 69

RESULTATS _____ 70

Galig, un nouveau gène humain emboîté dans le gène de la galectine-3 humaine, possède deux phases ouvertes de lecture traduites en deux protéines différentes de la galectine-3. _____ 68

1. Le locus du gène de la galectine-3 (*LGALS3*). _____ 68

2. Un ARNm, deux ORFs et deux protéines exprimées : la mitogaligine et la cytogaligine. _____ 69

3. Expression tissulaire différentielle des transcrits du gène *galig*. _____ 72

4. Effets cellulaires induits par l'expression du gène *galig*. _____ 73

CHAPITRE 1 : *Galig un nouveau gène humain inducteur de la mort cellulaire.* _____ 74

I. Mise en évidence du caractère cytotoxique du gène *galig*. _____ 74

II. *Galig* et mort cellulaire programmée. _____ 87

1. Modifications de la membrane plasmique. _____ 87

1.1. Matériel et méthodes. _____ 88

1.2. Résultat. _____ 90

2. Modifications nucléaires. _____ 90

2.1. Condensation de la chromatine. _____ 90

2.2. Clivage de l'ADN. _____ 91

3. Altérations des mitochondries. _____ 94

4. Caractéristiques biochimiques. _____ 95

4.1. Libération du cytochrome *c*. _____ 95

4.2. Activation des caspases. _____ 95

5. *Galig* et les protéines Bcl-2 et Bcl-X_L. _____ 100

5.1. Matériel et méthodes. _____ 100

5.2. Résultat. _____ 101

5.3. Conclusion. _____ 102

6. Conclusions. _____ 103

III. *Galig* et galectine-3. _____ 104

1. Matériel et méthodes. _____ 104

1.1. Culture cellulaire, transfection transitoire. _____ 104

1.2. Détection du cytochrome *c* cytosolique. _____ 105

2. Résultat. _____ 105

3. Conclusion. _____ 105

CHAPITRE 2: *Etude des relations structure /fonction de la mitogaligine.* _____ 106

I. Caractérisation du signal d'adressage mitochondrial de la mitogaligine. _____ 106

1. Matériel et méthodes. _____ 106

1.1. Construction des vecteurs. _____	106
1.2. Vérification et amplification des vecteurs. _____	109
1.3. Culture cellulaire, transfection transitoire, microscopie de fluorescence. _____	110
2. Résultat. _____	110
2.1. Extrémité N-terminale. _____	110
2.2. Extrémité C-terminale. _____	112
3. Conclusion. _____	113
II. Localisation mitochondriale et fuite de cytochrome c. _____	114
1. Libération de cytochrome <i>c</i> associée aux formes délétées en N et C -terminales de la mitogaligine. _____	114
1.1. Matériel et méthodes. _____	114
1.2. Résultat. _____	114
1.3. Conclusion. _____	115
2. Libération de cytochrome <i>c</i> associée à l'expression d'une seule ou des deux protéines codées par <i>galig</i> . _____	115
2.1. Matériel et méthodes. _____	115
2.2. Résultat. _____	116
2.3. Conclusion. _____	117
CHAPITRE 3 : Production d'anticorps dirigés contre la cytogaligine. _____	118
I. Production des protéines recombinantes chez <i>E. coli</i>. _____	119
1. Construction du vecteur pPROCLR (His-Cytogaligine). _____	119
2. Production des protéines recombinantes comportant une "étiquette" Histidine. _____	119
3. Immunisation. _____	120
4. Immunodétection de la cytogaligine. _____	121
4.1. Test des anti-sérums par <i>Western-Blot</i> . _____	121
4.2. Utilisation des sérums anti-cytogaligine en immunofluorescence. _____	125
Chapitre 4 : Etude de l'initiation de traduction de la cytogaligine. _____	131
I. Introduction. _____	131
II. Initiation de traduction de la cytogaligine dans l'ARNm leader du petit ARNm de <i>galig</i>. _____	136
1. Matériel et méthodes. _____	136
1.1. Constructions des différents vecteurs. _____	136
1.2. Résultat. _____	137
1.3. Conclusion. _____	138
CHAPITRE 5 : Détection des ARNm de <i>galig</i> par RT-PCR quantitative. _____	139
I. Principe. _____	139
II. Quantification des ARNm de <i>galig</i>. _____	140

1. Matériel et méthodes.	140
1.1. Contrôle des amorces	140
1.2. PCR	141
2. Résultat.	142
2.1. Calibration.	142
2.2. bExpression de <i>galig</i> après incubation des THP1 avec le PMA.	143
<i>DISCUSSION, CONCLUSION et PERSPECTIVES</i>	146
<i>I. Galig et mort cellulaire.</i>	147
1. Effet de l'expression de <i>galig</i> sur la morphologie cellulaire.	147
2. Le rôle de la mitochondrie dans la mort cellulaire induite par <i>galig</i> .	148
2.1. Activation des caspases.	148
2.2. Potentiel membranaire mitochondrial.	149
3. <i>Galig</i> et marqueurs de l'apoptose.	150
3.1. Marquage à l'annexine V.	150
3.2. Marquage Hoechst 33342.	150
3.3. Test TUNEL.	150
3.4. Inhibition de la mort cellulaire induite par <i>galig</i> .	151
<i>II. Implication de la mitogaligine dans la mort cellulaire induite par galig.</i>	154
1. Localisation intracellulaire de la mitogaligine.	154
2. Activité cytotoxique de la mitogaligine.	154
2.1. Expression de la mitogaligine et croissance cellulaire.	154
2.2. La mitogaligine induit la libération du cytochrome <i>c</i> .	154
3. Importance de la production des deux protéines codées par <i>galig</i> .	156
<i>III. La régulation de l'expression du gène galig.</i>	157
<i>ANNEXES</i>	159
<i>BIBLIOGRAPHIE</i>	160
<i>RESUME.</i>	180

ABREVIATIONS

A

aa : **a**cide **a**miné
 ADN : **A**cide **d**ésoxyribonucléique
 ADNc : **ADN** complémentaire
 ADNm : **ADN** mitochondrial
 ADP : **A**dénosine **D**i-**p**hosphate
 AIF : **A**ppoptosis **I**nducing **F**actor
 ANT : **A**denine **N**ucleotide **T**ranslocator
 Apaf-1 : **A**ppoptotic **p**rotease **a**ctivating **f**actor-**1**
 ARN : **A**cide **R**ibonucléique
 ARNm : **ARN** messenger
 ART : **A**ppoptosis-**R**egulating **T**argeting sequence.
 ATP : **A**dénosine **T**ri-**P**hosphate

B

Bak : **B**cl-2 antagonist **k**iller
 BAP 31: **B**-Cell Receptor **A**ssociated **P**rotein
 Bax : **B**cl-2 **A**ntagonist **X**
 Bcl-2 : **B** cell lymphoma **2**
 Bcl-X_L : **B**cl-2 homologue **X** **L**ong
 BET : **B**romure d'**é**thidium
 BH : **B**cl-2 **H**omology region
 BIR : **B**aculovirus **I**AP **R**epeat

C

CAD : **C**aspase-**A**ctivated **D**Nase
 Caspase : **C**ystéine **A**SPartate proté**A**SE
 CARD : **C**aspase **R**ecruitment **D**omain
 CDKN : **C**ycline-**D**ependent **K**inase Inhibitor
 Ced : **C**aenorhabditis **E**legans **D**eath / **C**ell **D**eath abnormal
 CG : **C**ytogaligine
 CMV : **C**ytomégalo**v**irus
 CrmA : **C**ytokine response **m**odifier **A**
 Cyt c : Cytochrome c
 Ct : **T**hreshold **C**ycle

D

Da : **D**alton
 DD: **D**eath **D**omain
 DED : **D**eath **E**ffector **D**omain
 DIABLO : **D**irect **I**AP-**B**inding protein with **L**ow pl
 DISC : **D**eath **I**nducing **S**ignalling **C**omplex
 DO : **D**ensité **O**ptique
 Drp-1 : **D**ynamin-**r**elated **p**rotein-**1**

$\Delta\Psi_m$: Différence de potentiel électrochimique de la membrane mitochondriale

E

EDTA : **E**thylène **d**iamine **t**étra acétate
 Egl-1 : **E**gg **l**aying abnormal **1**
 EGFP : **E**nhanced **G**reen **F**luorescent **P**rotein

F

FADD : **F**as **A**ssociated **D**eath **D**omain

G

Galig : **g**alactin-3 internal **g**ene
 GAPDH : **g**lyceraldéhyde-3-**p**hosphate **d**éshydrogénase humaine

H

Htr A2 : **H**igh **t**emperature **r**equirement **A**2.
 Hsp : **H**eat **s**hock **p**rotein

I

IAP : **I**nhibitors of **A**ppoptosis **P**roteins
 ICAD : **I**nhibitor of **C**aspase-**A**ctivated **D**Nase
 ICE : **I**nterleukin-1 **b** **C**onverting **E**nzyme
 IGF : **I**nsulin **G**rowth **F**actor
 IGF 1R : **I**nsulin **G**rowth **F**actor **R**eceptor
 Il : **I**nterleukine
 InsP3 : **I**nositol-1,4,5-tri**p**hosphate
 IPTG : **I**sopropyl- β -**D**-**t**hiogalactopyranoside
 IRES : **I**nternal **R**ibosome **E**nter **S**ite

L

LB : **L**uria-**B**ertani
 LTc : **L**ymphocyte **T** **c**ytotoxique
 LGALS3 : **L**ocus du gène de la **g**alactine-**3**
 Luc : **L**uciférase

M

MAC : **Mitochondrial-induced Apoptosis Channel**.
 MALT : **Mucosa-Associated Lymphoid Tissue**
 MCP : **Mort Cellulaire Programmée**
 MG : **Mitogaligine**
 MLS : **Mitochondrial Localisation Sequence**
 Mn-SOD: **Manganèse SuperOxyde Dismutase**.
 MW: **Molecular Weight**

N

NAIP : **Neuronal Apoptosis Inhibitor Protein**
 NK : **Natural Killer**
 nt : **nucléotide**

O

ORF : **Open Reading Frame**

P

PAGE : **Polyacrylamide gel electrophoresis**
 PARP : **Poly ADP-Ribosyl Polymerase**
 pb : **paire de bases**
 PCR : **Polymerase Chain Reaction**
 PEI : **Polyéthylènimine**
 PMA : **Phorbol 12-myristate 13-acétate**
 PMM : **Perméabilisation de la Membrane Mitochondriale**
 PMSF : **Phényl méthane sulfonyl fluorure**
 PTP : **Permeability Transition Pore**
 PS : **Phosphatidyl Sérine**

R

RE : **Réticulum Endoplasmique**
 RLU : **Relative Light Unit**
 ROS : **Reactive Oxygen Species**
 rTdT : **recombinant Terminal Deoxynucleotidyl Transferase**
 RT-PCR : **Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction**

S

SAB : **Sérum Albumine Bovine**
 SDS : **Sodium Dodécyl Sulfate**
 SIDA : **Syndrome Immunodéficience Acquise**
 Smac : **Second mitochondria –derived activator of caspases**
 SOD: **Superoxyde Dismutase**.
 SVF : **Serum Veau Foetal**

T

TE : **Tris-EDTA**
 TNF : **Tumor Necrosis Factor**
 TNF –R : **Récepteur du TNF**
 TUNEL : **TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling**
 TRADD: **TNF-R1 Associated Death Domain**
 Tris : **Tris(hydroxyméthyl)-amino-méthane**

V

VDAC : **Voltage Dependent Anionic Channel**
 VIH : **Virus de l'Immunodéficience Humaine**

X

XIAP : **X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein**

Z

z-VAD-fmk: **Carbobenzoxy-V(val)-A(ala)-D(asp)-fluorométhylketon**

INTRODUCTION

Les travaux présentés dans cette thèse font suite aux études antérieures effectuées au laboratoire concernant la régulation de l'expression du gène de la galectine-3 (gène *LGALS3*). La galectine-3 appartient à la famille des lectines. Une lectine (du latin *legere* : choisir) est une protéine, autre qu'une enzyme ou un anticorps, fixant spécifiquement des osides (Barondes *et al.*, 1994). Les galectines se lient de façon spécifique aux β -galactosides. La galectine-3 est une lectine soluble localisée dans le cytosol et le noyau, également associée à la membrane plasmique et sécrétée dans le milieu extracellulaire. Elle est impliquée dans les phénomènes d'adhésion (Sato *et al.*, 1993), de prolifération (Hamann *et al.*, 1991), et possède aussi des propriétés anti-apoptotiques (Akahani *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1996). L'étude de l'expression du gène *LGALS3* dans des lignées cellulaires humaines a révélé la présence, en plus d'ARNm codant la galectine-3, de transcrits initiés dans le second intron du gène *LGALS3* (Raimond *et al.*, 1995) (figure1).

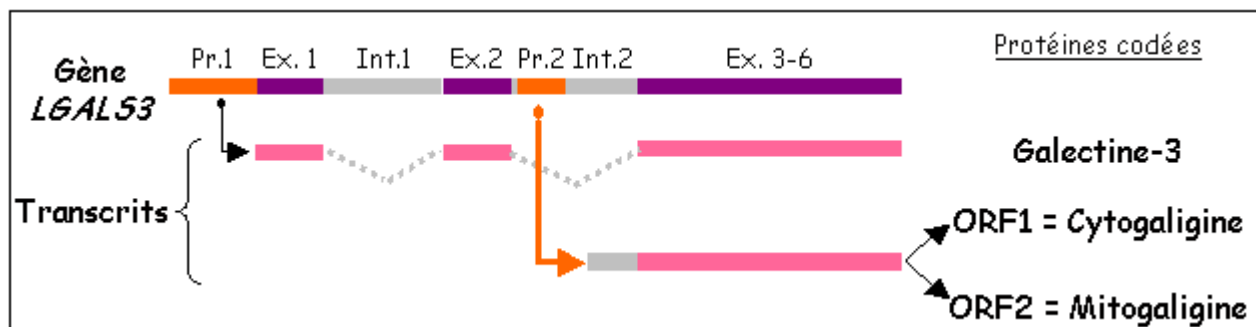


Figure 1 : Représentation schématique du locus *LGALS3*.

Pr. : promoteur (en orange), Ex. : exon 5 (en violet), Int. : intron (en gris).

La spécificité d'expression tissulaire de ces transcrits s'est avérée être différente de celle de la galectine-3 révélant ainsi une régulation indépendante des deux promoteurs (Guittaut *et al.*, 2001). De plus, les transcrits issus de l'activité du promoteur interne présentent la particularité de posséder deux cadres ouverts de lecture (ORF) différents et chevauchants permettant la traduction de deux nouvelles protéines distinctes de la galectine-3 (figure 1). Ces résultats ont permis de définir une structure génique complexe dans laquelle un gène est emboîté dans celui de la *galectine-3* humaine. Ce gène interne a été appelé **galig** pour : **gal**ectin-3 **i**nternal **g**ene (Guittaut *et al.*, 2001). Les deux nouvelles protéines, les galigines, exprimées dans des cellules eucaryotes en culture présentent des localisations cellulaires différentes, à l'origine de leur dénomination respective : la **cytogaligine** est localisée majoritairement dans le cytosol et le noyau alors que la **mitogaligine** est exclusivement localisée dans les mitochondries.

Mes travaux de thèse ont contribué à la mise en évidence du caractère cytotoxique de *galig* à l'origine de cette mort cellulaire génétiquement programmée. C'est pourquoi, dans la première partie de ce manuscrit nous allons "*rentrer au cœur de la mort des cellules*", et tenter de comprendre pourquoi ces processus de mort sont paradoxalement si importants pour la vie. Après quelques rappels historiques sur l'évolution des idées ayant conduit au concept de mort cellulaire programmée (MCP), nous décrirons les différentes formes et appellations de mort cellulaire ainsi que les principaux acteurs moléculaires impliqués dans la MCP. Enfin, nous montrerons que la mort cellulaire n'est pas un processus anarchique et délétère, mais bien un mécanisme ordonné et une fonction cellulaire vitale dont le dysfonctionnement peut entraîner de nombreuses pathologies pouvant conduire à la mort de l'organisme. La deuxième partie de ce manuscrit sera consacrée aux résultats obtenus lors de l'étude de la cytotoxicité de ce nouveau gène humain. Parmi les caractéristiques biochimiques qui accompagnent l'expression de *galig* dans les cellules humaines, la libération du cytochrome *c* a pu être reliée à une activité portée par la séquence d'adressage mitochondriale de la mitogaligine. Bien que certains des marqueurs classiques de la mort cellulaire par apoptose ne semblent pas impliqués dans la mort cellulaire induite par *galig*, nous avons cependant démontré qu'une protéine anti-apoptotique, Bcl-X_L, inhibe la cytotoxicité du gène. Ainsi, ces résultats permettent de penser que *galig* induit une mort cellulaire alternative à l'apoptose.

GENERALITES

I. La mort cellulaire programmée : un concept récent.

La disparition des cellules a longtemps été considérée comme un processus de déclin spontané, désorganisé et antagoniste de la vie. La mort ne pouvait résulter que d'accidents, de destructions, d'agressions de l'environnement. Elle représentait une phase terminale, une étape ultime de la vie (Ameisen, 2002). La recherche dans le domaine de l'apoptose semble, au regard de la figure 2, avoir longtemps été négligée et/ou son importance sous-estimée, puisqu'il apparaît que le nombre de publication concernant ce sujet d'étude "n'explose" qu'à partir des années 1990 (figure 2). Ceci n'est pas dû à l'utilisation tardive du terme "apoptosis" (1972) puisqu'un graphe similaire peut être obtenu avec l'expression "programmed cell death". En réalité, il a fallu qu'émerge un nouveau concept, celui que la mort pouvait être un processus prédéterminé, actif et vital.

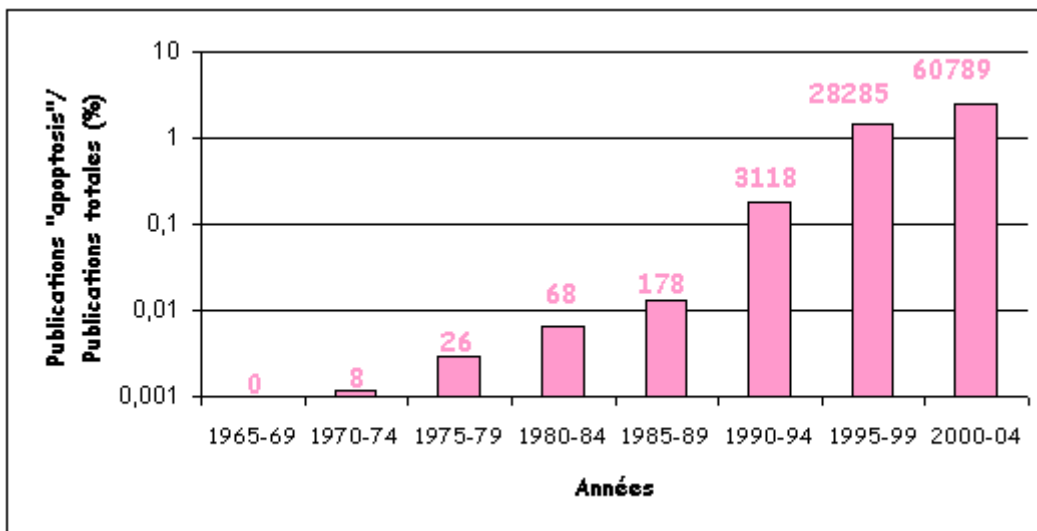
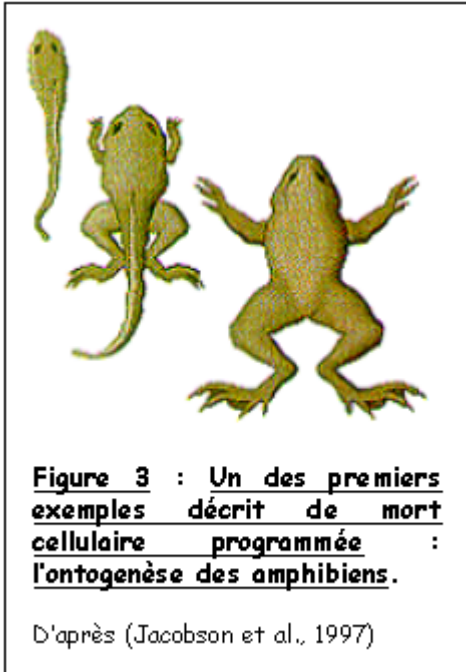


Figure 2 : Evolution du pourcentage et du nombre de publications contenant le terme "apoptosis" au cours des 40 dernières années.

Pour chaque période le nombre de publication est indiqué. Données issues de la banque PubMed (mars 2005).

Peu de temps après l'énonciation de la théorie cellulaire, (**Dutrochet** 1824, **Schwann** et **Schleiden** 1838/1839), qui affirme que les organismes vivants sont composés de cellules et que ces dernières représentent l'unité de structure et de fonction de la vie, des anatomistes remarquent que certaines cellules meurent lors du développement normal d'un animal.

D'abord observée en 1842 par **C. Vogt** (Vogt., 1842), lors de la métamorphose du crapaud accoucheur (figure 3), il a été rapporté (Glucksmann, 1951) qu'une **mort cellulaire "physiologique"** se produit dans de nombreux tissus au cours du développement d'organismes vertébrés et invertébrés. Il n'était pas encore dans les esprits que la mort des cellules pouvait tenir un rôle aussi important que leur prolifération dans la construction d'un organisme.



Ainsi, l'idée que le développement, avant tout considéré comme genèse et non-destruction nécessitait des épisodes de mort cellulaire commença à faire son chemin. Ces événements considérés auparavant comme un défi au bon sens, commencèrent alors à ne plus apparaître comme anecdotiques et négligeables.

La notion de **programme** a été proposée par **R.A. Lockshin** (Lockshin et Williams, 1964) afin de rationaliser ce que l'on commençait à observer, et tout juste à comprendre, des mécanismes moléculaires régissant la différenciation cellulaire et le développement embryonnaire (Saunders, 1966). Un programme, c'est "un ensemble de données nécessaires à une suite d'opérations", cela implique une succession d'événements qui s'enchaînent les uns aux autres dans un ordre prédéterminé. L'établissement de la mort cellulaire est comparé à l'exécution d'un programme : elle est programmée au sens où elle intervient à des moments précis du développement, en des zones précises de l'embryon et en mettant en jeu un programme génétique spécifique.

Un second pas a été franchi, lorsqu'il a été montré que des inhibiteurs de la synthèse d'acides ribonucléiques et de protéines inhibaient les morts cellulaires qui se produisent durant la métamorphose des amphibiens et des insectes (Lockshin, 1969b; Tata, 1966). Cette nécessité de synthèse de macromolécules indique que ce type de mort requiert une participation "active" de la cellule pour sa propre mort. Ainsi, la mort cellulaire n'est pas une détérioration passive comme on l'avait cru jusqu'alors, mais une voie de différenciation terminale de la cellule, nécessitant l'intervention de molécules spécialisées.

Au début des années 70, **J.F. Kerr**, **A.H. Wyllie** et **A.R. Curie**, établissent des critères morphologiques permettant de distinguer entre 2 types de mort cellulaire : l'une "organisée", dépendant de l'enclenchement d'un programme génétique, qu'ils dénomment "**apoptose**" et l'autre plus "anarchique" et passive appelée "**nécrose**".

Jusqu'en 1980, malgré les descriptions "standardisées" de la morphologie des cellules mourant durant l'apoptose, les voies moléculaires mises en jeu restent inconnues. C'est la mise en évidence du contrôle génétique de la mort cellulaire programmée durant le développement du ver *Caenorhabditis elegans* (figure 4) qui a permis la première identification de gènes impliqués dans l'apoptose (Horvitz, 1999). *Caenorhabditis elegans*, est un ver d'un millimètre de long, qui présente le double avantage de se développer rapidement et d'être translucide, ce qui permet de suivre directement au microscope les divisions des cellules.

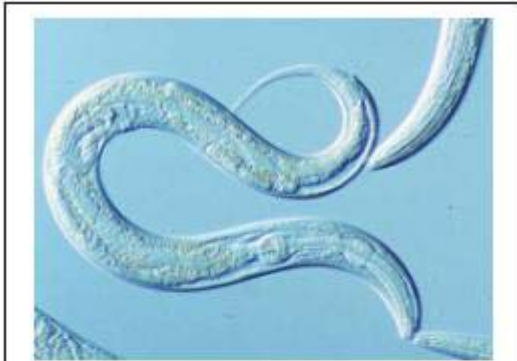


Figure 4 : Ver nématode *Caenorhabditis elegans*.

Organisme modèle choisi pour une approche génétique de l'étude de la mort cellulaire en raison de sa durée de vie courte (3jours), de sa transparence, de sa nombreuse progéniture, de sa facilité de propagation en laboratoire, et surtout en raison de la connaissance du nombre exact et de l'arrangement de toutes ces cellules, du stade 1 cellule au stade adulte. Photo : Laboratoire David Gems, University College London.

Ce ver possède jusqu'à 1090 cellules somatiques, adulte il n'en possède plus que 959. Au cours de son développement 131 cellules disparaissent (Horvitz, 1999). Cette MCP est très reproductible : c'est toujours la même cellule au même moment qui meurt. L'observation au microscope, de près de 50 000 vers exposés à un mutagène, permit d'isoler des individus chez qui trop peu de cellules mourraient et/ou trop de cellules mortes n'étaient pas éliminées (Horvitz *et al.*, 1983). L'analyse de ces mutants conduisit à l'identification des gènes **ced** (*Caenorhabditis elegans death* et/ou **cell death abnormal**) impliqués dans le contrôle de la MCP.

Le choix du modèle animal *C.elegans*, par **S. Brenner**, l'élucidation du devenir individuel de chaque cellule du nématode par **J.Sulston** et enfin l'identification des gènes contrôlant la mort cellulaire par **R.Horvitz** a permis à ces 3 auteurs de se voir attribuer le Nobel de médecine et de physiologie en 2002 pour leurs travaux sur la régulation génétique du développement des organes et la mort programmée des cellules. L'attribution de ce prix couronne l'aboutissement du concept de mort cellulaire programmée même si les étapes suivantes ont permis la caractérisation des acteurs moléculaires responsables, d'une part de la transduction des signaux de mort et d'autre part, de l'exécution de ces programmes (figure 5).

GENERALITES I. La MCP : un concept récent.

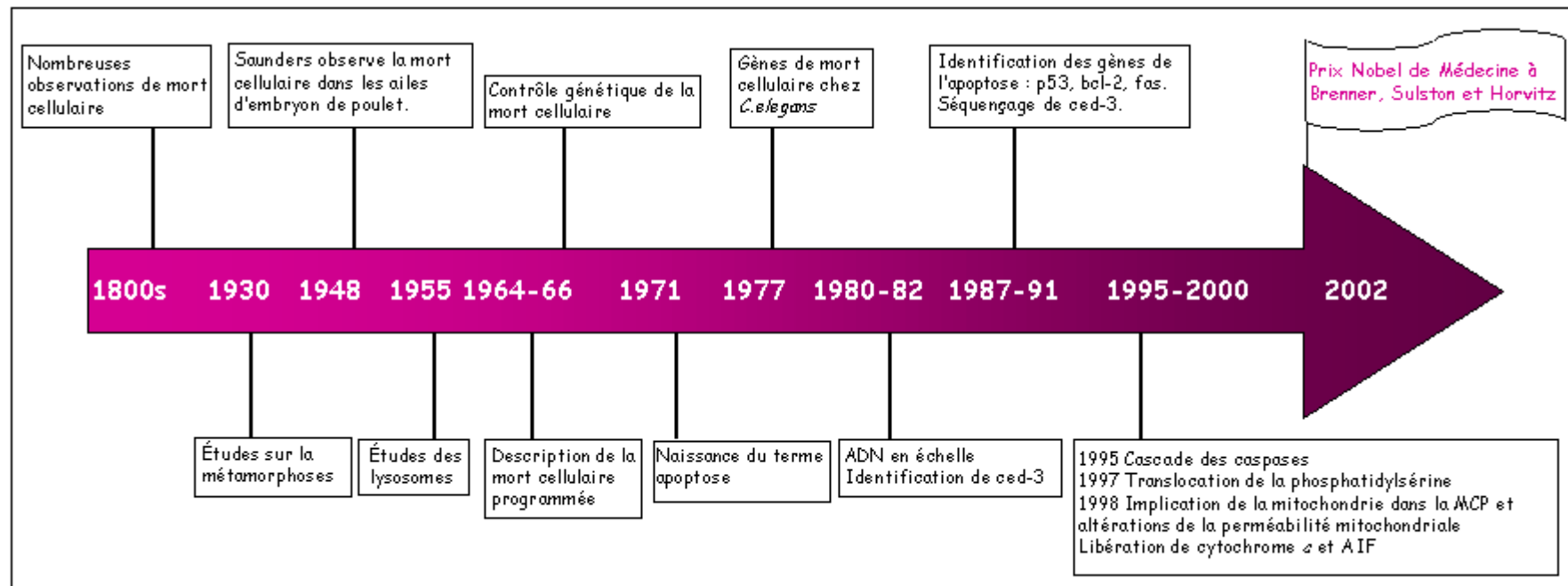


Figure 5 : Chronologie des études sur la mort cellulaire programmée.

Adapté de (Lockshin et Zakeri, 2001).

II. Pourquoi contrôler la mort cellulaire ?

Même si cette question peut apparaître quelque peu finaliste, on peut supposer que l'évolution a favorisé l'émergence d'un tel processus pour différentes raisons :

❖ Contrôle de l'homéostasie cellulaire.

Toutes les cellules d'un individu dérivent de la même cellule initiale : la cellule œuf qui au cours de nombreuses mitoses produit un organisme présentant les caractères de son espèce. On estime qu'un organisme humain adulte est constitué d'environ 50 milliards de cellules. Ce nombre de cellules est relativement constant au cours de la vie adulte (Meier *et al.*, 2000). Or chaque fois qu'un corps étranger (virus, bactéries, parasites, substances allergènes..) pénètre dans l'organisme, le système immunitaire est stimulé conduisant à une augmentation du nombre de leucocytes. Si aucun événement de mort cellulaire ne venait contrebalancer ces proliférations et maintenir l'homéostasie cellulaire, à 80 ans, un individu compterait la bagatelle de deux tonnes de moelle osseuse et ganglions lymphatiques (Melino, 2001) ! Ainsi, 95% des cellules du système immunitaire disparaissent par apoptose, libérant l'organisme des cellules non efficaces ou potentiellement auto-immunes (Yuan et Yankner, 2000).

Les cellules meurent sans cesse et pour ce faire, elles ont le pouvoir de déclencher leur autodestruction, leur propre mort (Merritt *et al.*, 1995; Pena *et al.*, 1997).

Alors, même si "mourir c'est cesser de vivre" selon la définition du *petit ROBERT*, la mort cellulaire apparaît comme consubstantielle de la vie, nécessaire et indispensable à la survie.

❖ Contrôle du développement.

Un organisme complexe ne peut se construire sans passer par des épisodes de "démolition". Dès les premiers jours qui suivent la fécondation, passé le stade de blastocyste, la mort cellulaire devient nécessaire au bon déroulement des étapes ultérieures du développement. Ce modelage permet d'ériger les structures et les formes spécifiques d'une espèce donnée. Chez l'Homme, la mort "sculpte" la forme des membres supérieurs (26^{ème} jour), inférieurs (27^{ème} jour), au 42^{ème} jour les mains sont encore en palette et éliminant les tissus séparant nos doigts, elle permet leur individualisation (figure 6) (Merino *et al.*, 1999).

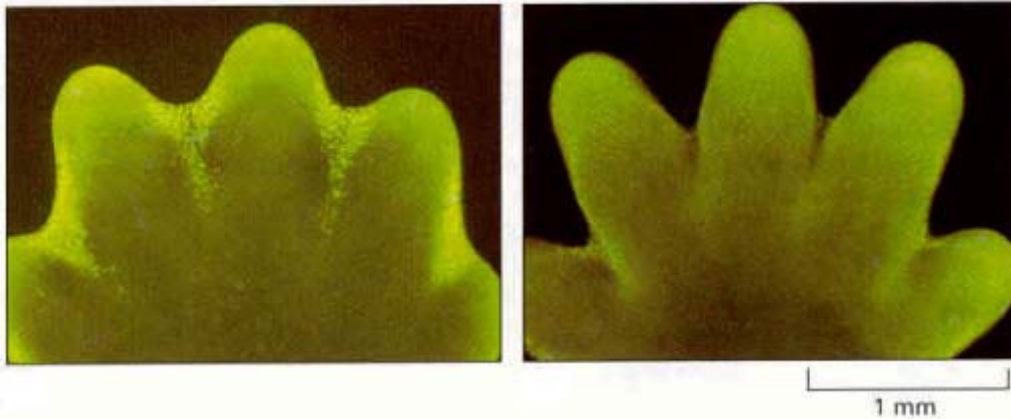


Figure 6 : Les différentes implications de la mort cellulaire programmée : l'individualisation des doigts lors de l'embryogenèse chez l'homme.

(Wood *et al.*, 2000)

La mort permet également de faire disparaître les ébauches des organes génitaux du sexe opposé (Jacobson *et al.*, 1997), elle est à l'origine de la chute des dents de lait et de la disparition du thymus etc..... La MCP permet une certaine plasticité nécessaire à l'adaptation des organismes et donc à la pérennité de l'espèce (Conlon et Raff, 1999). Cette plasticité est particulièrement évidente dans le développement du système nerveux central : 85% des neurones n'ayant pu établir de synapses dans le cerveau de l'embryon sont éliminés (Vaux et Korsmeyer, 1999).

❖ **Défense contre les infections ou les agressions physico-chimiques.**

Une ambiguïté pourrait apparaître lors de l'utilisation du terme programmé, ce qui est "programmé" n'est pas uniquement le destin individuel de chaque cellule, mais aussi, sa capacité à déclencher son autodestruction de façon prématurée en réponse à différents stress : infections virales, irradiations, agents génotoxiques, inhibiteurs de réplication.

La MCP participe ainsi, aux mécanismes de défense de l'organisme. Elle conduit à l'élimination des cellules modifiées et/ou infectées. Lors d'une infection virale, certaines cellules infectées vont mourir par MCP, limitant ainsi la réplication virale (Haecker et Vaux, 1994). Des signaux, à l'intérieur même de la cellule, peuvent traduire une atteinte de son intégrité et conduire à l'élimination des cellules endommagées par des agressions extérieures comme les UV, les produits chimiques et/ou anti-cancéreux ayant occasionné des dommages génétiques (Dyson *et al.*, 1986; Searle *et al.*, 1975).

❖ **Survie de la colonie chez les êtres unicellulaires.**

La différenciation, la régulation du nombre de cellules et la défense contre les infections ne sont pas des spécificités des organismes pluricellulaires (Ameisen, 1996; Ameisen *et al.*, 1996). Les organismes unicellulaires peuvent former des colonies, la survie du génome de l'organisme unicellulaire dépend autant de la survie de la colonie que de celle d'un des individus y participant. La colonie peut donc tirer un bénéfice à éliminer certaines cellules non désirables.

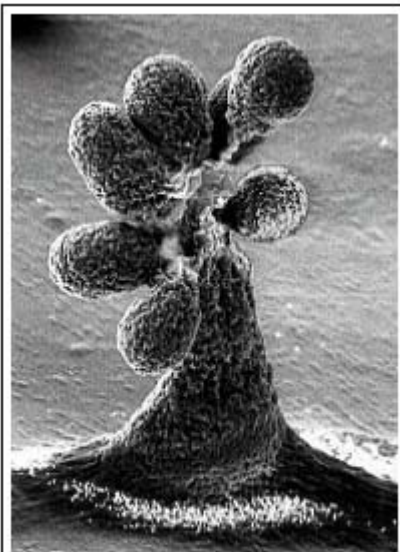


Figure 7 : Myxobacteria.

Adresse Internet
<http://www.natur.cuni.cz>.

Des processus de MCP peuvent ainsi être mis à profit et exécutés dans les organismes unicellulaires, y compris les bactéries.

Nous pouvons citer l'exemple des myxobactéries (figure 7) qui, lorsque l'environnement devient défavorable, s'assemblent en un corps multicellulaire. Le "tronc" et les "branches" sont constitués de cellules mortes qui se sont détruites. Au sommet du tronc, à l'abri, des cellules se sont différenciées en spores, et donneront quand l'environnement redeviendra favorable, naissance à une nouvelle colonie.

A ce jour, la MCP a été décrite dans 8 organismes eucaryotes unicellulaires (Arnoult *et al.*, 2002 ; Pozniakovsky *et al.*, 2005; Sen *et al.*, 2004). Au cours de l'évolution, ces processus d'auto-élimination auraient permis une adaptation optimale du nombre de cellules à l'environnement, et une régulation fine du cycle et de la différenciation cellulaire en réponse aux changements environnementaux (Ameisen, 1998; Ameisen, 2002; Ameisen *et al.*, 1996; Cornillon *et al.*, 1994).

III. La mort cellulaire : une question de formes..

Durant les 30 dernières années, la mort cellulaire a été catégorisée selon une dichotomie APOPTOSE/NECROSE. L'emploi du terme **mort cellulaire programmée** pour décrire l'apoptose a fait naître aussi une certaine confusion, car cela laissait suggérer que tous les programmes de mort cellulaire suivaient le schéma de l'apoptose. Cette supposition est largement reprise par de nombreux auteurs qui utilisent fréquemment les termes de mort cellulaire programmée et d'apoptose comme des synonymes pour décrire **une mort cellulaire physiologique** (Guimaraes et Linden, 2004; Schwartz *et al.*, 1993). A l'heure actuelle, l'accumulation de preuves morphologiques et biochimiques suggère clairement que la mort cellulaire programmée ne soit pas confinée à l'apoptose. L'apoptose n'est pas le seul phénotype de «l'autodestruction des cellules», ce que nous allons d'ailleurs illustrer dans cette partie par quelques exemples. La variété des programmes de mort cellulaire, pouvant être exécutés par une cellule, aboutit à une redondance des voies de mort cellulaire. Ceci souligne l'importance de ces processus de mort pour la cellule, de sorte que si une de ces voies est déletée, elle peut être compensée par le déclenchement d'une autre, permettant ainsi la survenue de l'autodestruction.

❖ La nécrose.

La nécrose est définie comme une mort passive, désordonnée, rapide, accidentelle, non régulée, par conséquent, elle est considérée comme le processus non programmé de destruction des cellules "lésées" ou comme une phase ultime de mort programmée (Lockshin et Zakeri, 2004a). Elle survient à la suite d'agressions violentes (hypoxie, hyperthermie, fortes compressions, infection virale lytique (Vaux et Strasser, 1996), attaque par le système du complément...),ou lors de lésions pathologiques (ischémie, infection, inflammation). Les cellules perdent leur équilibre ionique, se gorgent d'eau ce qui entraîne une déformation, une distorsion de la membrane plasmique (figure 8). Les organelles, les mitochondries entre autres, vont avoir tendance à gonfler, avant qu'intervienne la rupture des différents compartiments cellulaires, la cellule meurt en éclatant. Cette véritable explosion cellulaire conduit au relargage, dans le tissu environnant, du contenu cytoplasmique (Schwartzman et Cidlowski, 1993) et déclenche l'arrivée des mastocytes, provoquant une réaction inflammatoire locale pouvant entraîner des lésions tissulaires néfastes et irréversibles (Henson et Johnston, 1987). Cette forme de dégénérescence violente provoque la destruction de plusieurs cellules de la population et finalement la morphologie de la nécrose est variable et assez mal définie (Dong *et al.*, 1997).

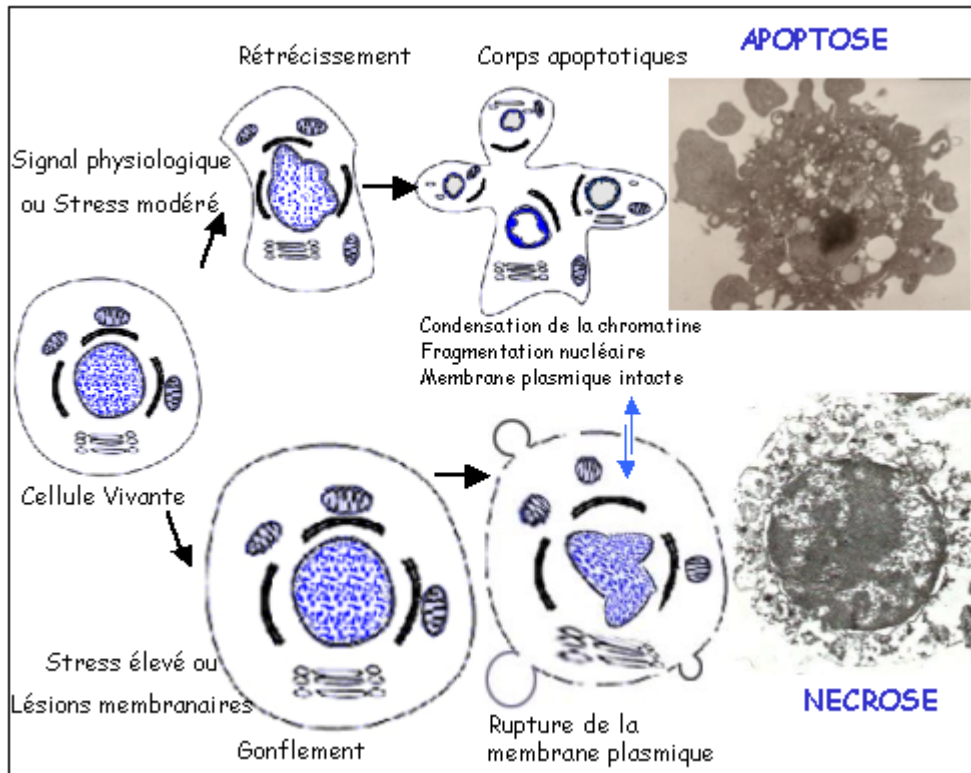


Figure 8 : Morphologies comparées des cellules apoptotiques et nécrotiques. L'apoptose ne laisse pas de "traces", la cellule "disparaît", tandis que la nécrose se compare à une "explosion", il y a des "dommages collatéraux" (les autres cellules), un "ménage" et des "réparations" sont nécessaires. Adapté de (Van Cruchten et Van Den Broeck, 2002).

❖ **L'apoptose.**

C'est à Kerr et ses collaborateurs qu'est attribuée la première utilisation du terme apoptose (Kerr *et al.*, 1972). Ce nom fait référence, étymologiquement, à la chute programmée des feuilles en automne ; **apo** pour désigner l'éloignement et **ptose** pour chute. Mais, ce terme fut utilisé, il y a plus de 2400 ans, par **Hippocrate** de Cos pour décrire des fractures osseuses, puis par **Galen** pour décrire la "chute des croûtes" qui font suite à la cicatrisation d'une blessure (Esposti, 1998). Puisque cette mort est très similaire selon les tissus et selon les organismes, Kerr et ses collaborateurs ont proposé qu'elle reflète la mise en route d'un même programme de mort intracellulaire qui peut être activé ou inhibé par divers stimuli physiologiques ou pathologiques. Schématiquement, cette mort cellulaire se déroule selon une suite **d'étapes ordonnées** :

- une phase d'initiation
- une étape de décision, où le processus de mort s'enclenche et ne peut être stoppé
- une phase d'exécution
- une phase de phagocytose.

Dans ce cas, la cellule reçoit « l'ordre » de mourir, c'est à dire de mettre en route son programme d'autodestruction. Le **signal apoptotique** peut provenir de l'extérieur, à

savoir de l'environnement cellulaire (voie extrinsèque) ou bien de l'intérieur même de la cellule (voie intrinsèque).

- Durant l'étape d'initiation, aucune modification morphologique n'est observée.

- L'étape de décision constitue le point de non-retour, la cellule perçoit les signaux moléculaires, émis par d'autres cellules, qui lui permettent de déclencher son autodestruction. La cellule apoptotique s'isole et perd ainsi tout contact avec les cellules voisines. Morphologiquement, ceci correspond à une rétraction progressive de la cellule, avec condensation du cytoplasme ce qui induit une diminution significative du volume de la cellule (figure 8). Ce rétrécissement de la taille cellulaire est imputable au relargage d'eau et d'ions dans le milieu environnant (Wyllie *et al.*, 1980), les organites cellulaires et la membrane plasmique restent intègres.

- Puis, durant la phase d'exécution du programme, il y a activation de nombreuses protéases présentes dans la cellule sous forme inactives et qui sont responsables, à terme, des changements morphologiques et biochimiques caractéristiques de l'apoptose. A la surface de la cellule, on observe comme des excroissances, des protubérances, des boursofflures bien caractéristiques du processus apoptotique, comme si la membrane plasmique se mettait à bourgeonner (photo figure 8). Ce phénomène est décrit dans la littérature sous le nom de « **blebbing** » (Brown *et al.*, 1992; Hengartner, 2000). La cellule se fragmente en plusieurs petits sacs étanches car enveloppés de membrane plasmique (Dive *et al.*, 1992). Cela correspond à la formation de corps apoptotiques renfermant une partie du cytoplasme et des organites cellulaires structurellement intacts. La conservation de l'intégrité de la membrane plasmique est l'un des critères essentiels de définition de l'apoptose Cette compartimentalisation constitue une sorte de "sécurité" qui permet de prévenir tout déversement de constituants intracellulaires, pouvant altérer les tissus alentours.

- Les corps apoptotiques formés sont ensuite rapidement phagocytés par les cellules adjacentes ou par des macrophages, au cours d'une phagocytose spécialisée appelée « **engulfment** » ou englobement. Cette élimination est primordiale car elle permet de ne laisser aucune trace dans le tissu où survient l'apoptose, et prévient en particulier toute nécrose secondaire qui aurait pour conséquence une libération aléatoire de contenu cellulaire toxique. Ceci permet ainsi d'empêcher la survenue d'une réaction inflammatoire locale.

❖ **L'autophagie.**

La découverte de la MCP chez *C.elegans* a fait tomber dans l'oubli qu'auparavant, la mort cellulaire était expliquée par l'intervention du compartiment lysosomal contenant les enzymes nécessaires à la lyse cellulaire (Lockshin, 1969a). La MCP autophagique se caractérise par la séquestration de constituants cellulaires par une « vague » de cytoplasme, formée probablement par des expansions membranaires du réticulum endoplasmique. Les vacuoles autophagiques résultant d'une fusion avec les lysosomes apparaissent alors dans le cytoplasme. On observe également, une dilatation des mitochondries et du réticulum endoplasmique et un « élargissement » de l'appareil de Golgi. Le nombre de mitochondries dans le cytoplasme diminue mais celles qui demeurent restent intactes, ce qui indiquerait que la cellule maintient un niveau d'ATP nécessaire et suffisant pour sa complète autodigestion. Comme pour l'apoptose, l'autophagie est complétée par la phagocytose. Cependant apoptose et MCP autophagique ne sont pas mutuellement exclusives, elles peuvent survenir simultanément dans un même tissu et même conjointement dans la même cellule : l'apoptose peut commencer avec l'autophagie et l'autophagie peut commencer avec l'apoptose (Lockshin et Zakeri, 2004a). Les limites entre ces deux types de MCP ne sont pas très claires.

Ce phénomène phylogéniquement très ancien, a pu être observé chez la moisissure *Dictyostelium discoideum*, le nématode *Caenorhabditis elegans* et aurait pu se développer avant même le processus apoptotique (Golstein *et al.*, 2003; Lockshin et Zakeri, 2004a).

L'autophagie est un processus physiologique constitutif, régulé et actif qui ne mène pas nécessairement à la mort de la cellule. Elle permet le renouvellement des organelles, des protéines, et le recyclage des constituants cellulaires lors des épisodes de carences nutritionnelles. Chez l'Homme adulte, elle contribue au maintien de l'homéostasie tissulaire lorsqu'une élimination massive de cellules est nécessaire : élimination des cellules sécrétoires en excès de la glande mammaire, des cellules prostatiques, de l'endomètre lors de l'atrophie de l'utérus après un accouchement (Bursch, 2001).

❖ **L'oncose.**

C'est une forme passive ou accidentelle de mort cellulaire, qui se rapproche beaucoup de la nécrose, elle est même parfois appelée nécrose primaire (Lecoeur *et al.*, 2001; Majno et Joris, 1995). Elle est caractérisée par un gonflement nucléaire et cytoplasmique, une vacuolisation du cytoplasme, un gonflement de la mitochondrie, mais surtout par la conservation de l'intégrité de la membrane plasmique, ce qui la différencie de la nécrose (Trump *et al.*, 1997)

L'oncose implique toute une population de cellules, elle a été décrite lors d'accidents ischémiques, lors de chocs toxiques induits par des agents chimiques sur des cellules hépatiques ou rénales, mais ne semble pas intervenir au cours de développement. Au niveau moléculaire, un récepteur de surface a été associé à la mort cellulaire par oncose (Baehrecke, 2002). Ici la mort cellulaire va survenir d'une façon anormale, lors de l'épisode ischémique par exemple, mais se déroulera selon un processus normal prédéterminé (Van Cruchten et Van Den Broeck, 2002).

❖ **La paraptose.**

La paraptose a été décrite lors du développement embryonnaire et dans des syndromes neurodégénératifs. Cette forme de MCP se distingue de l'apoptose par des critères morphologiques, biochimiques et par sa réponse aux inhibiteurs d'apoptose. Les cellules mourantes s'arrondissent, se détachent de leur substrat comme le feraient des cellules en apoptose. La paraptose se caractérise par l'apparition dans le cytoplasme de larges vacuoles apparemment remplies de liquide, par une absence de corps apoptotiques, et par une légère condensation de la chromatine (Sperandio *et al.*, 2000; Wyllie et Golstein, 2001).

❖ **La sénescence.**

La sénescence est synonyme du vieillissement physiologique qui intervient à différents niveaux : celui de l'organisme entier, celui des organes ou des tissus, celui des cellules qui ne se maintiennent pas en vie au-delà d'un certain nombre de division et enfin celui de la molécule, grandement responsable du vieillissement des niveaux supérieurs. La sénescence cellulaire a été décrite pour la première fois par Hayflick et Moorhead en 1961 (Hayflick et Moorhead, 1961).

Une des premières théories sur le phénomène de la sénescence, notamment au travers du vieillissement moléculaire, a été exposée par Orgel en 1963. Pour Orgel, le risque d'erreurs s'accroît avec l'âge et engendre l'accumulation de molécules altérées. Les altérations subies par ces molécules essentielles à l'activité cellulaire aboutissent à une modification critique du génome entraînant la sénescence et la mort.

Pour Hayflick la sénescence cellulaire est **génétiqument programmée**, ce serait une différenciation terminale commandée par des gènes du vieillissement (gérontogènes) qui ne s'exprimeraient qu'à la fin de la vie. La cellule "n'oublierait" jamais son âge comme si elle possédait une horloge interne. En 1965, Leonard Hayflick met en culture des fibroblastes humains. Durant la phase I, dite de prolifération rapide, la culture se développe normalement en une mono-couche cellulaire confluite.

A la suite des repiquages, les cellules se divisent plus lentement (phase II), elles mettent plus de temps à atteindre la confluence. Puis, vers le 50^{ème} repiquage, elles ne se divisent plus (phase III). Les cellules subissent un arrêt irréversible et permanent de leur cycle cellulaire, perdent leur pouvoir de transformation ou clonogénicité (Okada et Mak, 2004), donnent des signes de dégénérescence et meurent, c'est la **sénescence répllicative**. Ces cellules conservent l'intégrité de leur membrane plasmique, présentent des changements morphologiques tels qu'un cytoplasme aplati, une augmentation de granularité, des involutions au niveau de la chromatine, de l'ADN circulaire extra-chromosomique (Narita *et al.*, 2003). La sénescence peut aussi être induite par un grand nombre de stress cellulaires. Les cellules ne présentent alors pas de raccourcissement des télomères mais ont le morphotype de cellules sénescents (Campisi, 2001).

❖ **Mitoses catastrophiques (« Mitotic catastrophe »).**

Le terme de "mitose catastrophique" a été inventé par Paul Nurse et Paul Russell pour décrire le funeste destin des cellules de *Schizosaccharomyces pombe* contraintes d'entrer en mitose suite à la sur-expression d'une molécule impliquée dans le cycle cellulaire appelée Cdc2, l'homologue chez les mammifères de CDK1 (Russell et Nurse, 1986). "La mitose catastrophique", définit un type de mort cellulaire identifié dans les cellules de mammifères présentant un nombre aberrant de mitoses. On observe des cellules géantes multinuclées contenant des chromosomes non condensés. Si une cellule est lésée ou si l'ADN est endommagé, des points de contrôle (check point) sont activés avant l'entrée en phase G2. Il y a arrêt du cycle cellulaire le temps de la réparation, si la réparation est impossible, la cellule meurt par apoptose. Cependant, si le point de contrôle G2 est défectueux, la cellule entre en mitose prématurément avant que la réplication de l'ADN ne soit complète ou bien, avant que sa réparation ne soit terminée. Lorsque se profile cette mitose aberrante, la cellule meurt par "mitose catastrophique" (Okada et Mak, 2004). Des agents, induisant la dépolymérisation des microtubules et empêchant par conséquent la mise en place du fuseau mitotique, provoquent la mort de la cellule par mitose catastrophique. Ce processus de mort cellulaire apparaît être un mécanisme de réponse au stress hautement conservé, observé par exemple chez la drosophile. Des cellules mourant selon ce procédé ont été décrites chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer et durant l'embryogenèse du poulet. Les bases moléculaires régulant ce procédé restent encore à déterminer, des preuves récentes mettent en avant le rôle cytoprotecteur de la molécule survivine (Okada *et al.*, 2004).

Tableau 1 : Caractéristiques des différents types de mort cellulaire.

Nd: Non documenté, Adapté de (Okada et Mak, 2004).

Type de Mort Cellulaire	Noyau	Membrane Cellulaire	Cytoplasme	Caractéristiques biochimiques
Apoptose	Condensation de la chromatine. Fragmentation nucléaire ADN en échelle.	Bourgeonnement (blebbing)	Fragmentation et formation de corps apoptotiques	Dépendant des caspases Besoin d'ATP..
Autophagie	Condensation partielle de la chromatine Pas d'ADN en échelle	Bourgeonnement (blebbing)	Augmentation du nombre de vésicules dites autophagiques, des lysosomes, des mitochondries.	Indépendant des caspases. Augmentation de l'activité lysosomale
Mitoses Catastrophiques	Fragmentation nucléaire Multiples micro-noyaux	Nd	Nd	Indépendant des caspases (au stade précoce) Activation anormale de CDK1/cycline B
Nécrose	Floculation de la chromatine. Agrégation et dégradation au hasard de l'ADN	Gonflement (swelling) et rupture	Augmentation de la vacuolisation. Dégénérescence des organelles. Gonflement des mitochondries. Lyse complète	Pas d'inhibiteurs connus. Pas besoin d'énergie. Perte de l'homéostasie ionique.
Sénescence	Structure hétérochromatique caractéristique.	Nd	Aplatissement Augmentation de la granularité	Activité β -galactosidase Indépendant des caspases.
Paraptose	Condensation partielle de la chromatine. Pas de fragmentation nucléaire. Pas d'ADN en échelle	Pas de bourgeonnement (blebbing)	Augmentation de la vacuolisation.	Pas d'inhibition par les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 Indépendant des caspases.
Oncose	Gonflement nucléaire	Conservation de l'intégrité, Pas de rupture.	Gonflement des mitochondries. Augmentation de la vacuolisation.	Nd

IV. Quelques acteurs moléculaires de la MCP.

La mise en évidence des gènes **ced** contrôlant le programme de mort cellulaire chez *C.elegans* a contribué à la compréhension de la MCP chez les mammifères (Hengartner, 2000). La mort cellulaire chez *C. elegans* requiert l'intervention de 4 gènes principaux : **ced-3**, **ced-4**, **ced-9** et **egl-1**, considérés comme des régulateurs et des inducteurs de la mort de toutes ces cellules somatiques (figure 9).

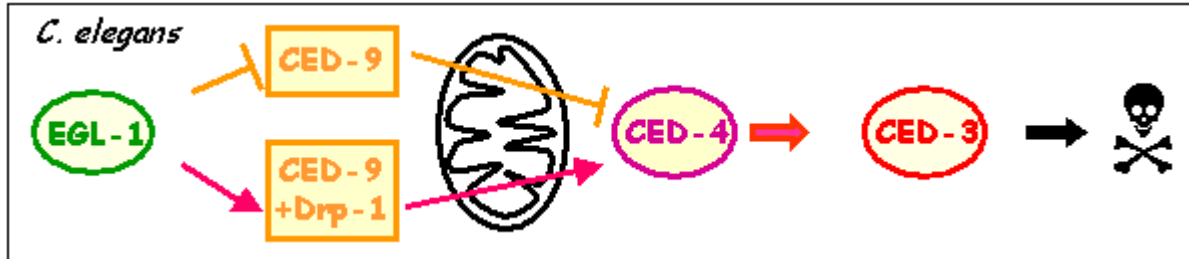


Figure 9 : Les protéines engagées dans le programme de mort chez *C.elegans*.

Adapté de (Youle, 2005) Inhibe, —| Active \Rightarrow

Au cours de l'évolution, le programme de mort s'est complexifié et a pu être adapté chez les mammifères où des homologues des protéines contrôlant la mort de *C.elegans* ont été retrouvées (figure 10).

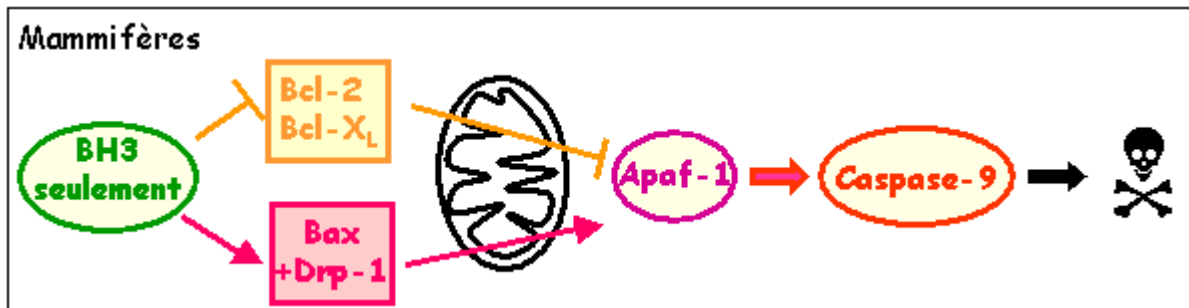


Figure 10 : Les protéines engagées dans le programme de mort chez les mammifères.

Adapté (Youle, 2005) Inhibe, —| Active \Rightarrow

- **Ced-3**, code pour une protéase à cystéine (**caspase**) homologue de l'enzyme ICE (*Interleukin-1 β Converting Enzyme*, caspase-1) effecteur de la cascade moléculaire (Miura *et al.*, 1993).
- **Ced-4**, protéine activatrice de Ced-3, a pour homologue mammalien la protéine **Apaf-1**.
- **Ced-9**, est un inhibiteur de Ced-4 (Hengartner et Horvitz, 1994). Sa contrepartie chez les mammifères correspond aux membres **anti-apoptotiques** de la **famille Bcl-2**.

La protéine Bcl-2 ou par extension les membres anti-apoptotiques préviennent la MCP (Hu *et al.*, 1998). Cependant, à la différence de ce que l'on peut observer chez *C.elegans*, Apaf-1 et les protéines Bcl-2 n'interagissent pas directement.

- **Egl-1**, est inhibiteur de Ced-9. Les protéines **pro-apoptotiques** de la **famille Bcl-2**, comportant seulement le domaine BH3, constituent les orthologues de Egl-1 chez les mammifères.

1. Les protéines de la famille Bcl-2 : le ying et le yang de la MCP.

Les protéines de la famille Bcl-2 exercent un contrôle critique dans les voies de signalisation de la MCP. Bcl-2 a été la première des protéines de cette famille mise en évidence (Bakhshi *et al.*, 1985). C'est l'identification de la translocation chromosomique t(14-18) de Bcl-2 dans le locus de la chaîne lourde des immunoglobulines conduisant à une expression constitutive de Bcl-2 à l'origine de lymphomes folliculaires malins, qui permis de mettre en évidence l'effet oncogénique de Bcl-2 (Tsujiimoto *et al.*, 1985a ; Tsujiimoto *et al.*, 1985b; Tsujiimoto *et al.*, 1984). A l'inverse des oncogènes connus à l'époque, bcl-2 ne favorise pas la prolifération cellulaire, mais bloque la mort cellulaire. En 1988, Vaux et ses collaborateurs découvrent que Bcl-2 inhibe la survenue de la MCP dans les cellules hématopoïétiques dans un système où la mort est induite par une privation d'Il-3 (Vaux *et al.*, 1988). Puis, il a été démontré que Bcl-2 pouvait prévenir la MCP induite par de nombreux autres stimuli comme la privation de sérum, le choc thermique, les agents chimiothérapeutiques, suggérant par conséquent la capacité de Bcl-2 à intervenir dans différentes voies moléculaires de MCP (Tsujiimoto, 1989).

1.1. Caractéristiques structurales.

Les protéines de la famille Bcl-2 ont été identifiées sur la base de la présence dans leur séquence d'au moins un domaine homologue à Bcl-2 (BH domain). Ces domaines conservés appelés domaines BH-1 à BH-4, pour « Bcl-2 Homology domain», s'organisent en hélice α (Adams et Cory, 1998). La présence de ces domaines BH est l'unité fondatrice de cette famille et permet d'y regrouper plusieurs protéines possédant au moins 1 domaine BH. Les protéines appartenant à cette famille ont des rôles antagonistes : les unes possèdent des propriétés prévenant la MCP (anti-apoptotiques), les autres des propriétés la promouvant (pro-apoptotiques) (Gross *et al.*, 1999). En interagissant physiquement entre elles, ces protéines de la famille Bcl-2 sont capables de former des homo-et hétéro-dimères *via* leurs domaines BH. Ces interactions modulent très souvent les effets pro- et anti-apoptotiques observés. La distribution des domaines BH dans les

protéines de la famille Bcl-2 et leurs propriétés anti- ou pro-apoptotiques de ces protéines ont permis une subdivision en trois sous-groupes (figure 11) :

➤ **Les protéines anti-apoptotiques** : Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W, Boo, Mcl-1, A1/Bfl-1...). Ce sont des protéines à **multidomains BH**. Elles possèdent, pour la plupart, les 4 domaines conservés BH-1 à BH-4.

➤ **Les protéines pro-apoptotiques** :

- **à multidomains BH** (Bax, Bak, Bok...). Les membres de cette famille contiennent les domaines BH1, BH2, BH3 (rarement BH4).

- **à domaines BH-3 seulement** (Bid, Hrk, Bik, Bim, Bmf, Bad, Noxa, Puma...). Ces protéines ne contiennent que le domaine BH3.

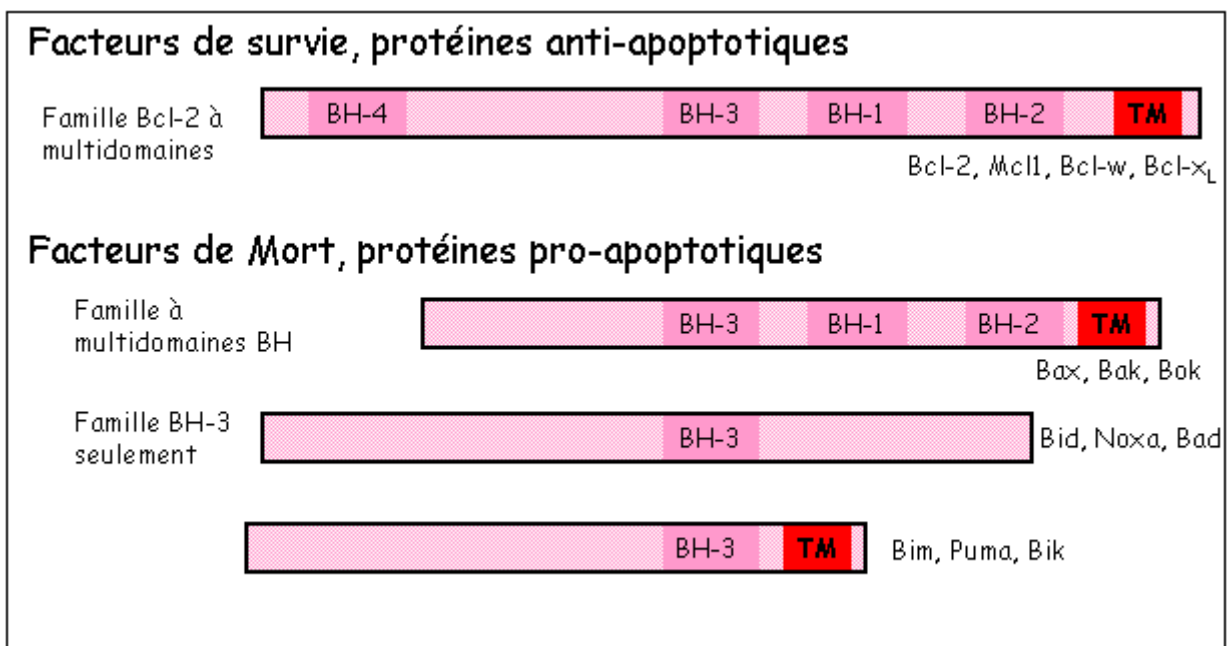


Figure 11 : Les trois sous familles des protéines Bcl-2.

BH : Bcl-2 Homology domain, TM : domaine trans-membranaire. Adapté de (Adams et Cory, 1998).

Indépendamment de leur fonction anti- ou pro-apoptotique, de leur nombre de domaines BH, ces protéines présentent souvent en C-terminal, un domaine transmembranaire potentiel (TM). Ce domaine leur confère la capacité à s'intégrer dans les endomembranes.

La réalité sur la diversité structurale des protéines de la famille Bcl-2 est plus complexe que cette classification ne pourrait le laisser croire. En effet, l'épissage alternatif des ARNm apparaît de plus en plus être une source importante de variabilité structurale et donc fonctionnelle de ces protéines. Ainsi, pour **Bid**, archétype de la protéine pro-apoptotique à domaine BH-3 seulement, 3 transcrits majeurs à l'origine de 3 isoformes ont été détectés : Bid(S), Bid(EL) et Bid(ES). Bid(S), l'isoforme la plus courte, est non

seulement dépourvue de domaine BH-3 mais en plus, elle antagonise l'effet pro-apoptotique de la forme activée de Bid (tBid) (Renshaw *et al.*, 2004).

A l'inverse, **Bcl-X_L** qui correspond à l'isoforme longue de Bcl-X, est une protéine anti-apoptotique à multidomaines BH alors que l'isoforme courte Bcl-X_S, issue d'un épissage alternatif, antagonise l'effet anti-apoptotique de Bcl-X_L (Boise *et al.*, 1993). De la même façon, la protéine **Mcl-1** est anti-apoptotique alors que l'isoforme courte Mcl-1_s, issue d'un épissage alternatif, est pro-apoptotique (Bingle *et al.*, 2000). Les deux formes de Mcl-1 peuvent former des dimères mais seule la forme longue peut interagir avec des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 tel que Bax (Bae *et al.*, 2000).

La localisation intracellulaire peut également être affectée par ces épissages alternatifs. C'est le cas pour **Bcl-2** dont l'isoforme majoritaire α possède un TM en C-terminal et donc la capacité à s'insérer dans les endomembranes, alors que Bcl-2_β constitue la forme soluble, dépourvue de TM et également beaucoup moins anti-apoptotique que l'isoforme longue (Hockenbery *et al.*, 1990). Quant à **Bfl-1** qui est généralement décrite comme étant une protéine anti-apoptotique à localisation mitochondriale, un épissage alternatif peut produire une forme courte (Bfl-1S) qui se localise dans le noyau et conserve un effet anti-apoptotique (Ko *et al.*, 2003). Enfin, on peut citer le cas du gène de **Bim** dont l'épissage alternatif pouvant générer 6 transcrits différents, peut être à l'origine d'une différence de régulation de la protéine : l'isoforme Bim(EL) contient un site de phosphorylation absent dans les autres formes (Shinjyo *et al.*, 2001). On pourrait multiplier les exemples à l'envie pour illustrer l'importance de l'épissage alternatif dans la régulation de l'expression des gènes des protéines de la famille Bcl-2, démontrant par-là combien il est important pour la cellule de contrôler précisément ces facteurs de vie ou de mort.

1.2. Modes d'action des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2.

Les protéines de la famille Bcl-2 intègrent les signaux de survie et ceux indicateurs des dommages cellulaires, puis fixent le seuil à partir duquel, suivant le contexte, la cellule va "s'engager" dans la mort. Leur fonction principale, lors de la MCP, est de contrôler la perméabilité de la mitochondrie et ainsi d'influer sur la libération de facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux. La mitochondrie est donc au centre de la décision VIE / MORT de la cellule puisqu'elle est à la fois le centre énergétique de la cellule et la cible de protéines impliquées dans le contrôle de la mort cellulaire.

1.2.a. Structure et fonctions de la mitochondrie.

Vers 1890, Altman découvre dans les cellules des granules qui ressemblent à des bactéries et en 1897 Benda introduit le terme de mitochondrie (mitos : filaments, chondros : granules).

La mitochondrie est le seul organe à disposer d'une double membrane (figure 12) délimitant deux compartiments sub-mitochondriaux : l'espace intermembranaire et la matrice. La membrane interne contient des complexes multi-enzymatiques répertoriés en trois grandes classes : les enzymes de la chaîne respiratoire, le complexe ATPase, des transporteurs spécifiques (figure 13). Ces endomembranes se caractérisent par la présence d'un phospholipide anionique spécifique des mitochondries, la **cardiolipine**. La membrane externe contient 3 % cardiolipine et la membrane interne a un taux supérieur à 20 %.

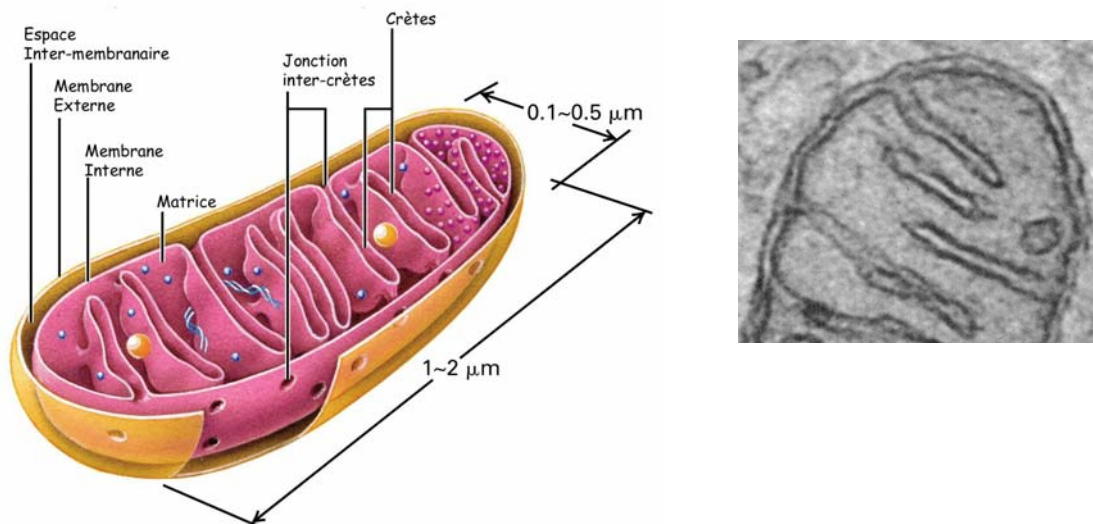


Figure 12 : Schéma et photographie de microscopie électronique illustrant la structure de la mitochondrie.

La matrice contient l'ADN mitochondrial (double brin bleu), des ribosomes (petites sphères bleues), des granules (sphères jaunes) (issu de Molecular cell biology 4^{ème} édition Lodish, Berk, Matsudaira, Zipursky, Baltimore, Darnell).

Les mitochondries sont "les centrales et les réservoirs" d'énergie cellulaire, elles couplent la synthèse et le stockage de l'énergie sous forme d'ATP : "fournisseur universel d'énergie" Le métabolisme mitochondrial (cycle de Krebs) permet la production des cofacteurs réduits de type $\text{NADH} + \text{H}^+$ et FADH_2 , qui en étant ultérieurement réoxydés par la **chaîne respiratoire** permettront la synthèse d'ATP (figure 13) (**phosphorylation oxydative**).

Le transfert des électrons se fait par l'intermédiaire de 4 complexes multi-enzymatiques constitués de protéines spécifiques et de groupements prosthétiques fortement intégrés à la membrane interne à l'exception du **cytochrome c**. L'énergie d'oxydoréduction provenant du fonctionnement de la chaîne respiratoire est utilisée pour

la translocation active de protons H^+ au travers de la membrane interne, depuis la matrice jusqu'au cytoplasme. Ce gradient de protons active l'ATPase, responsable de la synthèse d'ATP. Il participe également avec des transporteurs ioniques à l'établissement d'une différence de potentiel transmembranaire mitochondriale ($\Delta\Psi_m$).

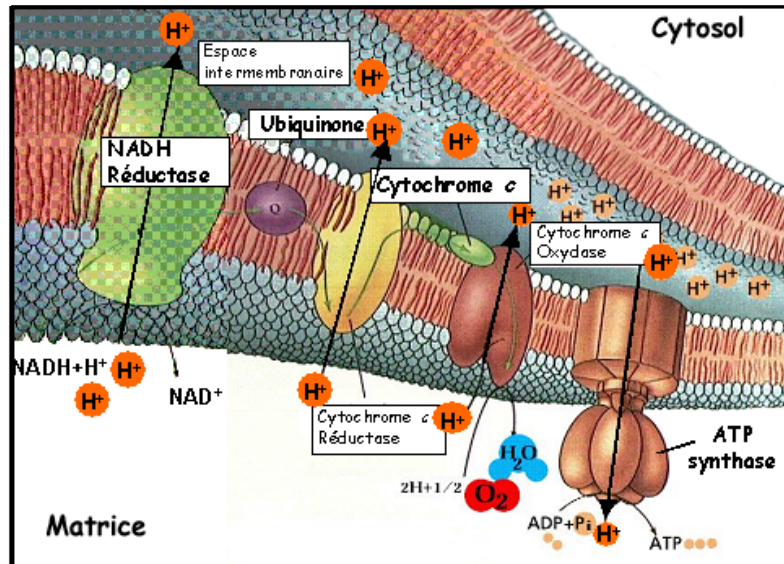


Figure 13 : Chaîne respiratoire mitochondriale.

Images modifiées d'après Purves et al., *Life: The Science of Biology*, 4th Edition, by Sinauer Associates (www.sinauer.com) and WH Freeman (www.whfreeman.com).

Outre ce rôle énergétique majeur, la mitochondrie est très impliquée dans les mécanismes de mort cellulaire (Green et Reed, 1998). Au cours des épisodes de MCP la morphologie mitochondriale peut être modifiée : gonflement, condensation ou même fragmentation des mitochondries sont souvent observés (Frank *et al.*, 2001; Kroemer *et al.*, 1997; Scorrano *et al.*, 2002). Les travaux de Newmeyer (Newmeyer *et al.*, 1994) prouvent que les mitochondries sont nécessaires à l'induction des modifications nucléaires typique de la MCP. Par la suite, l'observation de la **dépolarisation mitochondriale** (chute du $\Delta\Psi_m$) au cours de l'apoptose a renforcé l'idée d'une participation de la mitochondrie dans les processus de MCP (Kroemer *et al.*, 1995). Enfin, en 1996 le laboratoire de X.Wang (Liu *et al.*, 1996) met en évidence l'implication du **cytochrome c** (Kluck *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1997), et par conséquent de la mitochondrie, dans le déclenchement mais aussi dans l'amplification de signaux qui conduisent à la mort de la cellule.

Ces découvertes n'ont pas été acceptées instantanément par la communauté scientifique, car le modèle d'étude et de référence de la MCP, le ver *C.elegans*, n'avait pas montré son implication. De plus, il persistait la notion intuitive que les acteurs de la mort participaient uniquement à cette fonction, or la mitochondrie était connue pour jouer un rôle dans le "maintien en vie" de la cellule.

1.2.b. Les modèles de perméabilisation mitochondriale par les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2.

Les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 induisent la libération de facteurs apoptogènes mitochondriaux par régulation de la perméabilisation mitochondriale. Différentes hypothèses permettent de modéliser cette perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie.

1.2.b.i. Modulation de l'ouverture de canaux existants.

❖ Le premier modèle postule l'ouverture par Bax d'un méga-canal appelé le pore de transition de perméabilité (PTP). La **transition de perméabilité mitochondriale** (TPM) est une soudaine augmentation de la perméabilité de la membrane interne à l'eau et aux solutés de masse moléculaire inférieure à 1,5 kDa. Cette entrée massive entraîne un gonflement de la matrice mitochondriale, « swelling ». La membrane interne présentant de nombreuses invaginations, sa surface est donc bien plus importante que celle de la membrane externe. Ainsi, lors de la dilatation de la matrice, l'expansion de la membrane interne induit la dislocation de la membrane externe libérant ainsi le contenu de l'espace intermembranaire. La membrane interne ne cède pas à la pression osmotique, et reste intègre : le contenu de la matrice reste donc dans la mitochondrie (Martinou et Green, 2001).

La structure de ce pore est peu caractérisée. Il serait enchâssé à la fois dans les membranes internes et externes des mitochondries en un endroit où les deux membranes sont apposées. Le PTP serait formé par l'association du translocateur nucléotidique à adénosine (ANT) exportant l'ATP en échange de l'ADP, localisé dans la membrane interne, du VDAC (canal anionique voltage dépendant) localisé dans la membrane externe, de la cyclophiline D (CypD) localisée dans la matrice, et peut-être d'autres protéines comme la créatine kinase, l'hexokinase, le récepteur des benzodiazépines (Crompton, 1999). L'ouverture du PTP peut être induite par l'accumulation de cations Ca^{2+} dans la matrice, le phosphate inorganique (Pi), les ROS, des variations de pH. Dans ce modèle, la chute du $\Delta\Psi_m$, le découplage des phosphorylations oxydatives n'apparaissent pas être nécessaires à l'exécution de la MCP (Zamzami et Kroemer, 2001) (figure 14 a).

Le gonflement mitochondrial inhérent à ce modèle n'est pas toujours observé laissant supposer que la perméabilisation mitochondriale n'implique pas le PTP (Gogvadze *et al.*, 2004; von Ahsen *et al.*, 2000).

❖ Alternativement Bax interagirait avec VDAC entraînant un changement conformationnel important, à l'origine de l'ouverture du pore, permettant la fuite d'effecteurs pro-apoptotiques. (Shimizu *et al.*, 2000; Shimizu *et al.*, 1999) (figure 14 b).

La taille du pore pourrait constituer une limite à ce modèle puisqu'il semblerait qu'il ne puisse laisser passer des effecteurs de masses supérieures à 1,5 kDa ce qui est, par exemple, incompatible avec une libération de cytochrome c.

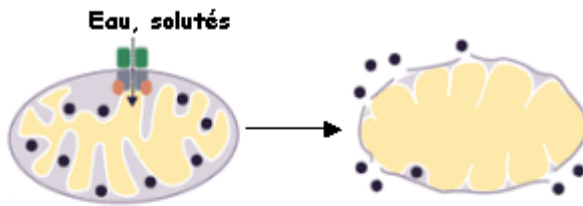
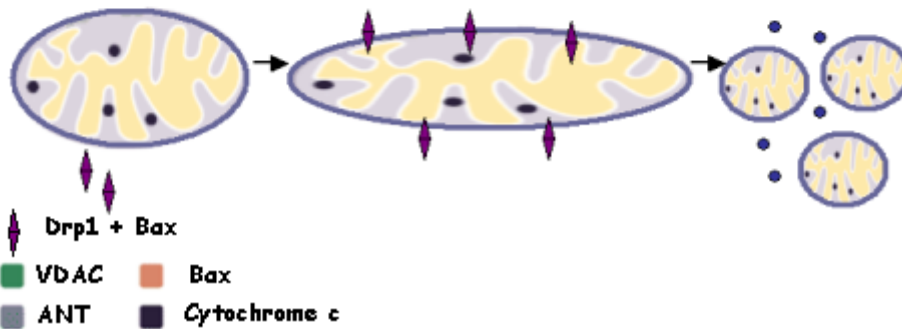
❖ La caractérisation électrophysiologique des courants générés dans la membrane externe des mitochondries sous l'action de Bax a également permis de postuler l'existence d'un canal ionique appelé MAC (Mitochondrial Apoptosis-induced Channel), différent du PTP, dont l'ouverture serait modulée par Bax (Pavlov *et al.*, 2001). Ce canal MAC n'étant observé que dans les mitochondries apoptotiques une incertitude demeure sur la possibilité pour ce canal d'être pré-existant dans les membranes mitochondriales ou résultant de l'insertion/oligomérisation de Bax (Guihard *et al.*, 2004)

1.2.b.ii. Formation de canaux par les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2.

❖ Ce modèle repose sur la capacité de Bax à former des canaux notamment dans des membranes phospholipidiques synthétiques (Antonsson *et al.*, 1997 ; Epand *et al.*, 2002a ; Kuwana *et al.*, 2002; Schlesinger *et al.*, 1997). Cette interaction est favorisée par la présence de lipides anioniques de type cardiolipine (Lutter *et al.*, 2000), phospholipide spécifique des membranes mitochondriales. Bax peut s'associer en oligomères de différentes tailles pour former des canaux suffisamment larges pour libérer le cytochrome c (Antonsson *et al.*, 2000) (figure 14 c).

❖ L'exposition de Bax recombinant monomérique à certains détergents permet son oligomérisation. Cet oligomère, composé de 6 à 8 molécules de Bax, forme des canaux dans la membrane externe de la mitochondrie. L'oligomérisation de Bax semble être un processus irréversible, les détergents, tout comme la formation d'un hétérodimère avec tBid, forme activée par protéolyse de Bid, induisent un changement conformationnel de Bax lui permettant de s'associer à la membrane mitochondriale, d'induire sa perméabilisation et de conduire à la MCP (Desagher *et al.*, 1999) (figure 14 d), un processus similaire est envisagé pour la protéine mitochondriale Bak. Le changement de conformation de Bax permet la formation d'un oligomère, pré-requis à l'insertion dans la membrane et à la constitution du canal (Antonsson *et al.*, 2000).

La forme active de Bid, tBid, est également capable de s'oligomériser et de provoquer la fuite de liposomes (Kudla *et al.*, 2000; Schendel *et al.*, 1999)

Modulation de canaux existants.**a) Ouverture du PTP****b) Canal Bax-VDAC****Formation de canaux.****c) Pore lipidique ou complexe protéine-lipide****d) Canal Bax****e) Fission mitochondriale.****Figure 14 : Différents modèles proposés pour la libération mitochondriale du cytochrome c.**

Durant la mort cellulaire, des facteurs mitochondriaux sont relargués dans le cytosol. Dans les modèles a) et b) il y a modulation de l'ouverture de canaux existants. Le modèle a) engage l'ouverture du pore de transition de perméabilité (PTP), le gonflement de la matrice mitochondriale induit la rupture de la membrane externe et permet la libération extramitochondriale de facteurs pro-apoptotiques tandis que le modèle b) engage la coopération de Bax et du VDAC (canal anionique voltage dépendant) pour libérer les effecteurs apoptotiques. Dans les modèles c), d) un large canal est formé dans la membrane externe de la mitochondrie, et permet le relargage des facteurs mitochondriaux, enfin le modèle e) repose sur une fission mitochondriale induite par les protéines Drp-1 (Dynamin related protein 1) et Bax. D'après et adapté de (Desagher et Martinou, 2000)

1.2.b.iii. Fission mitochondriale.

La biogenèse des mitochondries est un phénomène complexe qui met en jeu le noyau et la mitochondrie elle-même. Les mitochondries se reproduisent par croissance à la suite de la synthèse coordonnée de ses constituants moléculaires.

A partir d'un certain volume mitochondrial, il y a coupure de la membrane interne, formation de deux vésicules matricielles et segmentation de la membrane externe. Ainsi des événements de fission participent à la morphologie et à la multiplication "naturelle" des mitochondries. Néanmoins, au cours de la MCP il a été observé une division des mitochondries en petits organites ponctiformes. La protéine Drp-1 (Dynamin-Related protein 1) participe à la scission de la membrane externe (figure 14 e). Cette protéine cytosolique peut se localiser en des sites préférentiels de la membrane mitochondriale lors de la mise en route de la MCP. La surexpression de Drp-1 est accompagnée d'une diminution de la re-capture intramitochondriale de Ca^{2+} (Szabadkai *et al.*, 2004). L'inhibition de la fission ne permet pas, la formation d'organites ponctiformes, la chute du $\Delta\Psi_m$ et la libération du cytochrome c, et bloque ainsi la MCP. Cela laisse penser que la fission mitochondriale pourrait intervenir dans la libération d'effecteurs de mort (Frank *et al.*, 2001). Bax s'associerait à Drp-1 afin de fragmenter les mitochondries (Breckenridge *et al.*, 2003; Karbowski *et al.*, 2002)

Par ailleurs, la participation de la mitochondrie dans la MCP chez les mammifères constituait, jusqu'à aujourd'hui, une différence essentielle avec le modèle d'étude *C. elegans*. Récemment, la fragmentation mitochondriale a été mise en évidence au cours du développement de *C. elegans*. Elle est induite par EGL-1 et peut être bloquée par des mutations dans le gène Ced-9. Drp-1 a également été mise en évidence chez *C. elegans* et semble nécessaire et suffisante à la fragmentation mitochondriale dans la MCP chez ce nématode (Jagasia *et al.*, 2005).

1.3. Régulation de l'activité des protéines de la famille Bcl-2.

L'activité des protéines de la famille Bcl-2 peut être régulée de différentes façons. Les protéines pro-apoptotiques sont pour la plupart cytosoliques, elles subissent un changement de conformation pour se relocaliser essentiellement au niveau mitochondrial. Cette relocalisation peut être régulée par dimérisation/oligomérisation, par clivage ou par phosphorylation.

1.3.a. Dimérisation/oligomérisation.

Les membres anti-apoptotiques sont quasiment toujours localisés dans les membranes, celle du RE, du noyau ou dans la membrane externe des mitochondries, et dans ces dernières, plus précisément en des sites de contact entre la membrane interne et externe (Krajewski *et al.*, 1993; Nguyen *et al.*, 1993). La dimérisation leur permet d'exercer leur fonction inhibitrice de la MCP. A noter qu'aucune oligomérisation n'est

requis à leur activité, comme cela est le cas pour les protéines pro-apoptotiques (Antonsson *et al.*, 2000).

En effet, les protéines anti-apoptotiques se présentent sous forme de monomère et aucun dimère Bcl-2/Bcl-2 n'a été détecté *in vivo* dans des transfections stables (Conus *et al.*, 2000).

Les membres pro-apoptotiques sont pour la plupart présents dans le cytosol. La protéine Bax est localisée, sous une forme inactive et monomérique, dans le cytoplasme des cellules non-apoptotiques. Après la survenue d'un signal de mort, Bax subit un changement de conformation et se relocalise à la mitochondrie (Antonsson *et al.*, 2001; Gross *et al.*, 1998; Roucou et Martinou, 2001). Ces modifications conformationnelles permettent le démasquage d'une séquence d'adressage mitochondriale, et supposent donc que des domaines hydrophobes sont masqués, puis exposés de façon à promouvoir le ciblage et l'insertion membranaire de l'oligomère. Des variations de pH cytosolique peuvent induire le changement de conformation de Bax qui accompagne sa redistribution à la mitochondrie (Cartron *et al.*, 2004c). Un mode d'activation identique est retrouvé chez son homologue fonctionnel Bak, déjà présent au sein des membranes mitochondriales. La formation d'oligomère est également essentielle à son activité (Mikhailov *et al.*, 2003). La présence de tBid est nécessaire à l'oligomérisation des protéines Bax et Bak (Roucou *et al.*, 2002; Ruffolo et Shore, 2003 ; Wei *et al.*, 2000) (figure 15). La nature du ou des domaines de Bax permettant son interaction avec Bid restait jusque récemment inconnu. Il semble désormais que se soit l'hélice $\alpha 1$ de Bax qui permette une interaction avec le domaine BH-3 de Bid (Cartron *et al.*, 2004a).

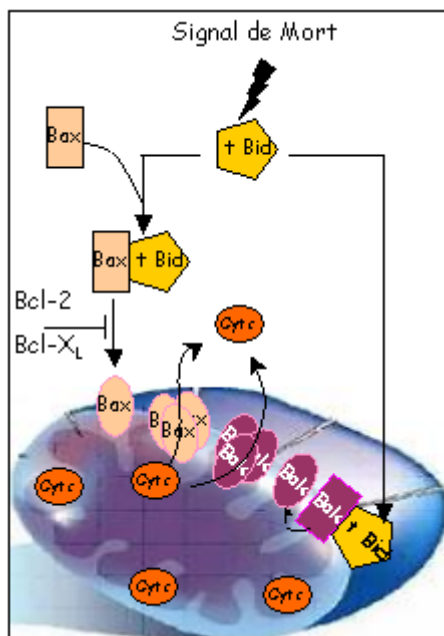


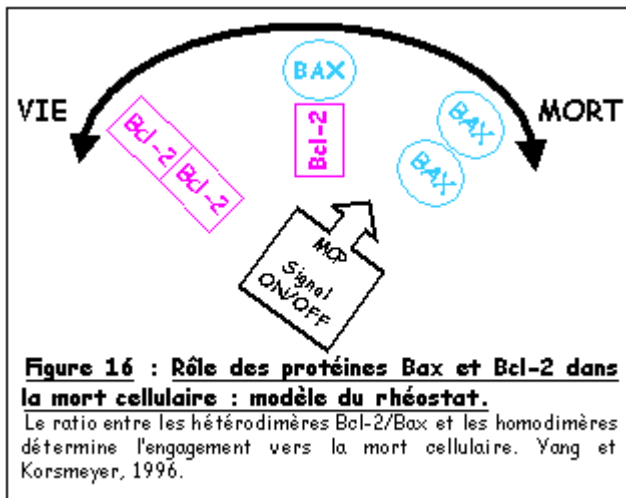
Figure 15 : Activation de Bax et Bak par tBid.

Les protéines pro-apoptotiques à multidomaines BH, localisés dans le cytosol ou dans la membrane externe de la mitochondrie, sont activés par les membres de la famille BH-3 seulement. Après avoir interagi avec tBid, Bax subit un changement conformationnel, s'insère dans la membrane externe, s'oligomérisent et libèrent le cytochrome *c* et d'autres facteurs de mort à partir de l'espace intermembranaire mitochondrial. tBid peut aussi se transloquer à la mitochondrie où il active Bak lequel est constitutivement ancré à la membrane mitochondriale. Bak subit aussi un changement de conformation, s'oligomérisent et perméabilise la membrane mitochondriale.

Les protéines anti-apoptotiques Bcl-X_L et Bcl-2 inhibent le changement de conformation de Bax et/ou son insertion. Adapté de (Martinou et Green, 2001).

Par ailleurs, il a été montré que Bcl-2 et Bax sont capables de s'hétérodimériser par l'intermédiaire des domaines BH (Yin *et al.*, 1994). La surexpression de Bax inhibe les propriétés anti-apoptotiques des protéines de la famille Bcl-2, ceci suggère une

régulation au travers d'interaction protéine/protéine entre les membres pro- et anti-apoptotiques.



Ce modèle propose que Bcl-2 interagisse avec Bax pour exercer son activité répressive sur la mort, et laisse supposer que des stratégies qui induisent la destruction de ces complexes seraient promotrices de la MCP. Ainsi la décision de vivre ou de mourir, résiderait dans l'équilibre entre "protéines de vie/protéines de mort" (Yang et Korsmeyer, 1996).

La proportion de dimères anti- ou pro-apoptotiques formés déterminerait ainsi la sensibilité ou la résistance d'une cellule à induire la MCP, et serait à l'origine du concept de « rhéostat » (figure 16) (Oltvai *et al.*, 1993).

L'oligomérisation est importante dans le contrôle de l'activité des membres de la famille Bcl-2 et pourrait être le seul mécanisme d'action de certains de ses membres. En effet, certaines protéines de la famille BH-3 seulement n'exercent leur activité inductrice de mort qu'après hétérodimérisation, par leur domaine BH3, avec une autre protéine Bcl-2 anti-apoptotique. Bad s'associe avec Bcl-X_L, pour induire la MCP (Zha *et al.*, 1997), de même pour Bid qui interagit avec Bcl-2. Ainsi Bik, Bim, Bad, Noxa, Puma, Bmf ne semblent pas posséder d'activité apoptotique intrinsèque, ils interagissent avec Bcl-2 et/ou Bcl-X_L et non avec les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak pour induire la MCP. Ils réduiraient ainsi la capacité de Bcl-2 et/ou Bcl-X_L à former des homodimères protecteurs et favoriseraient la constitution de dimères pro-apoptotiques (Tsujiyama, 1998). A l'inverse Bid, sous sa forme active tBid, forme des homo trimères dans la membrane mitochondriale, et participe ainsi à la MCP (Grinberg *et al.*, 2002).

1.3.b. Clivage.

Le clivage de Bax (forme p21^{Bax}) par la calpaïne ou la cathepsine-D génère la forme p18^{Bax} déletée des 33 premiers aa en N-terminale (Wood et Newcomb, 1999). Cette forme tronquée de Bax augmente les propriétés apoptogènes de Bax (Cao *et al.*, 2003; Toyota *et al.*, 2003). Pourtant p18^{Bax} ne contient plus le domaine ART (apoptosis-regulating targeting sequence) (Goping *et al.*, 1998) contenant le signal d'adressage mitochondrial de p21^{Bax} (Cartron *et al.*, 2003). Ce signal, important pour la translocation mitochondriale de Bax durant la phase exécutive de l'apoptose, est contenu dans l'hélice $\alpha 1$. Ces données semblaient contradictoires, il semble en fait que p18^{Bax} entre en

compétition avec p21^{Bax} pour interagir avec les membres anti-apoptotiques, favorisant ainsi l'activité apoptotique de Bax à la mitochondrie.

p18^{Bax} ne serait donc pas un activateur direct de l'apoptose mais jouerait le rôle d'une protéine à domaine BH-3 seulement. (Cartron *et al.*, 2004b).

Un autre exemple concerne Bid, substrat d'une protéase homologue de Ced-3, la caspase-8 (Li *et al.*, 1998). La coupure de Bid libère Bid tronqué ou (tBid) qui possède alors un domaine BH-3 exposé. tBid va subir une N-myristoylation, facilitant son ancrage à la mitochondrie où tBid participe à la phase d'exécution de la MCP.

Les protéines anti-apoptotiques sont les seules à posséder le domaine BH-4, à proximité de celui-ci se présente un site de coupure et une boucle qui est impliquée dans la régulation de l'activité. Les protéines Bcl-2 et Bcl-X_L subissent un clivage protéolytique par la caspase-3. Non seulement le clivage dans la région de la boucle réduit leur activité anti-apoptotique, mais en plus les produits tronqués deviennent apparemment inducteurs de MCP (Cheng *et al.*, 1997).

1.3.c. Phosphorylation.

La phosphorylation des protéines est un des mécanismes les plus communs de régulation post-traductionnelle. Les kinases semblent intervenir dans l'amplification de stimuli extérieurs et/ou dans l'intégration de différents signaux avant que la cellule ne s'engage dans la MCP (Anderson, 1997). La phosphorylation de Bad dans des lignées dépendantes de facteurs de croissance est un bon exemple de ce type de régulation. En présence d'Il-3, facteur de survie, Bad est phosphorylée sur une sérine par la kinase Akt (Zha *et al.*, 1996). Cette phosphorylation maintient Bad dans le cytosol, associée (Datta *et al.*, 1997b) avec la protéine cytosolique 14-3-3. En l'absence de facteurs de survie, Bad est déphosphorylée et peut donc se libérer de la protéine 14-3-3. Une fois le domaine BH-3 de Bad libéré, il transloque vers la mitochondrie, où il peut interagir avec la protéine Bcl-X_L et bloquer l'action protectrice de cette dernière, et ainsi exercer sa fonction promouvant la mort de la cellule (Fadeel *et al.*, 1999).

Un traitement de cellules au Taxol ou avec d'autres drogues affectant l'intégrité des microtubules, induit la phosphorylation d'une sérine de Bcl-2, et inhibe sa fonction anti-apoptotique (Haldar *et al.*, 1995). Bcl-X_L est aussi phosphorylée après la dépolymérisation des microtubules. Raf1 pourrait être la sérine/thréonine kinase responsable de la phosphorylation de Bcl-2 puisqu'il a pu être démontré qu'elles interagissaient dans la membrane mitochondriale. Il est supposé que la perte de fonction anti-apoptotique soit en partie due à la perte de capacité de Bcl-2 de se lier à Bax. En revanche, la phosphorylation de Bcl-2 sur Ser 70 semble nécessaire pour son action anti-apoptotique. Les conséquences fonctionnelles de la phosphorylation de Bcl-2 sont

davantage basées sur l'arrêt de la mitose plutôt que sur l'induction de la MCP (Scatena *et al.*, 1998).

2. La libération extra-mitochondriale de facteurs pro-apoptotiques : armes fatales !

L'engagement de la mitochondrie dans la mort cellulaire est largement documenté et implique **la perméabilisation** de sa membrane. Le mécanisme par lequel elle survient n'est pas franchement élucidé et reste un sujet de controverse mais contribue à la dissipation du gradient ionique existant dans la mitochondrie. La mitochondrie est considérée comme un "centre décisionnel", puisque les signaux inducteurs et inhibiteurs de mort y convergent. Si les signaux de mort "l'emportent" la membrane mitochondriale est perméabilisée. La mitochondrie renferme des protéines potentiellement dangereuses et leur libération apparaît comme l'événement critique pour le déclenchement de l'apoptose, événement partagé avec **l'autophagie** et **la nécrose**. En effet, un véritable cocktail de protéines effectrices de la MCP (Newmeyer et Ferguson-Miller, 2003), normalement séquestrées, dans l'espace inter-membranaire de la mitochondrie, est libéré (ex : cytochrome *c*, AIF, Endonucléase G, Smac/DIABLO, HtrA2/Omi ...) (Green et Reed, 1998 ; Hengartner, 2000; Kroemer et Reed, 2000) de même que des espèces toxiques (ex : ROS) qui restent normalement confinées dans la mitochondrie sont relarguées.

2.1. Cytochrome *c*.

Sous l'action de divers stimuli pro-apoptotiques, le cytochrome *c* mitochondrial est libéré dans le cytosol (Liu *et al.*, 1996). En se liant à Apaf-1 (Apoptosis protease activating factor-1) ce cytochrome *c* ectopique provoque notamment l'activation d'une cascade de protéases (les caspases) conduisant à la destruction protéolytique de la cellule. Le cytochrome *c* peut également interagir avec le récepteur InsP3 du réticulum endoplasmique et provoquer ainsi une vague de calcium cytosolique délétère pour la cellule (Boehning *et al.*, 2003). Le cytochrome *c* est libéré de manière soudaine, rapide et totale indépendamment de l'intensité du signal apoptotique et de la température (Goldstein *et al.*, 2000). Ces résultats montrent que la libération du cytochrome *c* suit une loi de "tout ou rien" et que ce phénomène est indépendant d'un système de transport enzymatique. La libération de tout un cocktail de protéines séquestrées dans l'espace intermembranaire indique que ce mécanisme de fuite n'est pas spécifique du cytochrome *c*. La dissipation du $\Delta\Psi_m$ accompagne la libération du cytochrome *c* mais, cette dépolarisation mitochondriale n'est ni nécessaire ni une conséquence directe du relargage du cytochrome *c* (Bossy-Wetzel *et al.*, 1998). Par ailleurs, il a également été démontré que la cellule parvenait à conserver un $\Delta\Psi_m$ après la diffusion du cytochrome *c* même en présence d'oligomycine (inhibiteur de l'ATPase) (Goldstein *et al.*, 2000).

Par conséquent une quantité résiduelle de cytochrome *c* est présente dans la mitochondrie. Soit ce cytochrome *c* correspond à un stock non libérable, soit ce cytochrome *c* a été re-capté dans l'espace intermembranaire, afin de participer au transport des électrons, ce dernier phénomène ayant déjà été observé *in vitro* (Kluck *et al.*, 1999). Le maintien du $\Delta\Psi_m$ et donc de la production d'ATP serait nécessaire à la formation de l'apoptosome (complexe cyt *c*/Apaf-1/pro-caspase-9/dATP) après la libération de cytochrome *c*.

2.2. AIF.

L'**AIF** (*Apoptosis-inducing factor*) est une flavoprotéine de 57 kDa à activité NADH oxydase localisée dans l'espace intermembranaire mitochondriale (Miramar *et al.*, 2001; Susin *et al.*, 1999). Tout comme le cytochrome *c*, il s'agit d'une molécule phylogénétiquement ancienne puisqu'elle possède des homologies avec de nombreuses oxydoréductases à NADH d'eubactéries et d'archaebactéries (Daugas *et al.*, 2000; Miramar *et al.*, 2001). En réponse à des stimuli de mort cellulaire, l'AIF est transférée de la mitochondrie dans le cytoplasme et migre dans le noyau où il se lie à l'ADN par des interactions électrostatiques (Ye *et al.*, 2002). Cette redistribution concomitante de la chute du $\Delta\Psi_m$ est suivie d'une condensation de la chromatine à la périphérie du noyau et d'une fragmentation de l'ADN (Jozsa *et al.*, 2001; Loeffler *et al.*, 2001; Susin *et al.*, 1999). Cette fragmentation de l'ADN serait due à une induction allostérique de nucléases par l'AIF (Wang *et al.*, 2002).

2.3. Endonucléase G.

L'AIF n'est pas capable d'induire seul la fragmentation oligonucléosomique de l'ADN, celle-ci nécessite l'implication d'une nucléase : l'**endonucléase G** mitochondriale (Endo G) (Li *et al.*, 2001). Comme l'AIF, l'Endo G est codée par un gène nucléaire et importée à la mitochondrie. Elle interviendrait dans la réplication de l'ADN mitochondriale (ADNm). Elle se trouve libérée dans le cytosol en même temps que les autres facteurs mitochondriaux intervenants dans la mort cellulaire. Ainsi, au moins une petite portion d'Endo G se localiserait dans l'espace inter-membranaire et non dans la matrice où a lieu la réplication de l'ADNm. Son activité nucléase est apparemment conservée depuis le ver jusqu'au mammifère, ce qui signifierait que cette protéine participerait à une ancienne voie de mort cellulaire conservée au cours de l'évolution (Wang, 2001).

2.4. Smac/DIABLO.

La protéine Smac/DIABLO (*Second mitochondria-derived activator of caspase/Direct IAP-binding protein with low pI*), est une protéine mitochondriale codée par le génome nucléaire (Du *et al.*, 2000 ; Verhagen *et al.*, 2000). Elle est synthétisée sous forme d'un précurseur de 239 aa possédant une séquence d'adressage mitochondriale N-terminale de 55 résidus. Ce signal d'adressage est clivé au cours de la translocation de Smac/DIABLO dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie. En réponse à un stimulus de mort, les mitochondries endommagées relarguent Smac/DIABLO dans le cytosol où elle interagit avec les inhibiteurs de caspases (IAP). Cette liaison aux IAPs permettrait la dissociation du complexe IAP/caspases conduisant à l'activation des caspases et donc à l'exécution de la MCP (Srinivasula *et al.*, 2001).

2.5. HtrA2/Omi.

HtrA2 (*High temperature requirement A2*) est une protéine de choc thermique initialement caractérisée chez *E. coli* sur la base de sa double fonction de protéine chaperonne à basse température et de sérine protéase à haute température (Spiess *et al.*, 1999). Son homologue mammalien, la protéine Omi (Faccio *et al.*, 2000) a été initialement décrite comme étant une protéine ubiquitaire du RE, il s'agit en réalité d'une protéine majoritairement mitochondriale dans les cellules non-apoptotiques (Suzuki *et al.*, 2001). Elle est codée par un gène nucléaire qui est contrôlé positivement par la protéine p53 (Jin *et al.*, 2003). Concomitamment à sa translocation dans la mitochondrie, HtrA2/Omi s'auto-active par clivage protéolytique de son signal d'adressage mitochondrial. Au cours de l'apoptose, elle est libérée dans le cytosol (Suzuki *et al.*, 2001) où elle forme des homotrimères qui inactivent irréversiblement les IAP par coupure protéolytique (Yang *et al.*, 2003). Contrairement à Smac/DIABLO dont l'action anti-IAP repose sur une liaison stœchiométrique et réversible, HtrA2/Omi agit de façon catalytique et irréversible. De ce fait l'inactivation des IAP par HtrA2/Omi apparaît plus efficace (Verhagen *et al.*, 2002). La perte d'activité protéasique de HtrA2/Omi due à la mutation du résidu Ser 276 en Cys est à l'origine du phénotype de dégénérescence neuronale observé dans les souris mutantes mnd2 (motor neuron degeneration-2) confirmant ainsi l'importance de cette sérine protéase dans les voies de MCP (Jones *et al.*, 2003). Les souris HtrA2/Omi^{-/-} ne montrent pas de réduction de mort cellulaire mais souffrent, d'une perte importante de neurones. Ces troubles neurodégénératifs conduisent à la mort des souris 30 jours après la naissance (Martins *et al.*, 2004). La surexpression de HtrA2/Omi induit une mort cellulaire avec un phénotype atypique, la condensation cellulaire n'est pas accompagnée de blebbing membranaire, ni d'une condensation de la chromatine et aucune activité caspase n'est détectée.

2.6. ROS.

L'oxygène de l'air que nous respirons, nécessaire pour produire de l'énergie, subit une réduction conduisant à la production d'eau. Cette réaction est catalysée par la cytochrome oxydase, présente dans le complexe IV de la chaîne de transport des électrons, (figure 13), et conduit aux intermédiaires O_2^- , H_2O_2 et $\cdot OH$. Ces intermédiaires sont appelés espèces réactives de l'oxygène (ROS) car ils présentent une réactivité beaucoup plus importante que l'oxygène dont ils dérivent. Les mitochondries sont la principale source endogène de production de ROS, mais également leur cible durant la MCP. Les phénomènes de stress oxydant ont pour origine un dysfonctionnement des systèmes enzymatiques de régulation du métabolisme de l'oxygène (superoxyde dismutase, catalase et glutathion peroxydase). Les radicaux hydroxyles sont des oxydants puissants, les plus dommageables du stress oxydant en raison de leur extrême réactivité, ils "attaquent" tous les matériaux biologiques : ADN, lipides, protéines. Les mitochondries sont donc continuellement exposées aux ROS susceptibles de causer la peroxydation des lipides membranaires, le clivage de l'ADNm et le blocage de la production d'ATP, autant de stress cellulaires induisant la MCP (Huang *et al.*, 1999). Les ROS peuvent être à l'origine du déclenchement de l'apoptose ou participer à l'amplification du signal apoptotique :

- Un stress oxydant génère la formation de H_2O_2 , ce qui induit une diminution de la production d'ATP, l'ouverture du PTP et la libération d'effecteur de l'apoptose tel que le cytochrome *c* (Tiwari *et al.*, 2002). L'observation que la surexpression de la superoxyde dismutase mitochondriale (Mn-SOD) peut bloquer l'apoptose a conforté le fait que les ROS peuvent induire la MCP. (Nomura *et al.*, 1999).

- A la suite d'un signal de mort, les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 induisent la perméabilisation de la membrane mitochondriale (Kuwana *et al.*, 2002). La libération du cytochrome *c* permet la formation de l'apoptosome et l'activation de la caspase-3. Cette dernière interagit avec les mitochondries perméabilisées, induit la dissipation du $\Delta\Psi_m$ et la production de ROS. Le relargage du cytochrome *c* est associée à l'inhibition de la respiration mitochondriale, la perturbation de la régulation du métabolisme de l'oxygène génère également la production de ROS, leur concentration intracellulaire est également augmentée (Esposito *et al.*, 1999). Au cours, de cette voie de signalisation de l'apoptose, l'expression de Bcl-X_L inhibe la mort cellulaire (Ricci *et al.*, 2003), la production de ROS apparaît dépendante des caspases et contribuerait à la mort cellulaire (Tan *et al.*, 1998).

3. Les caspases : la cascade de la mort !

Le clonage des gènes responsables de la MCP chez *C.elegans* a montré l'existence d'homologues chez les mammifères et a révélé le prototype d'une famille de gènes codant des protéases à cystéine regroupées sous le nom de **CASPASE**. Le **C** représente la cystéine du site actif : **QACxG** et **asp-ase** définit la spécificité stricte de clivage, après un acide aspartique, des substrats de cette famille de protéases. A ce jour 14 caspases (Nicholson et Thornberry, 1997) ont été identifiées chez l'homme. ICE (*Interleukin-1 β Converting Enzyme*) fut chronologiquement la première caspase caractérisée, et fut renommée caspase-1. La similarité entre ced-3 et ICE fut la première indication suggérant qu'un programme de mort cellulaire dépendant des caspases résulte de clivages protéiques (Thornberry et Lazebnik, 1998).

3.1. Structure des caspases.

Pour garder le programme apoptotique sous contrôle, et pour assurer un déclenchement rapide, les caspases sont initialement présentes dans les cellules, sous forme de précurseurs inactifs (zymogènes ou pro-enzyme), les pro-caspases. Ces enzymes ont une structure très conservée (figure 17), et dans leur forme inactive elles sont constituées (Wilson *et al.*, 1994):

- d'un pro-domaine N-terminal de taille variable
- d'un domaine qui deviendra, après clivage, la grande sous-unité (p20) portant le site catalytique
- d'un domaine qui deviendra après clivage la petite sous-unité (p10)

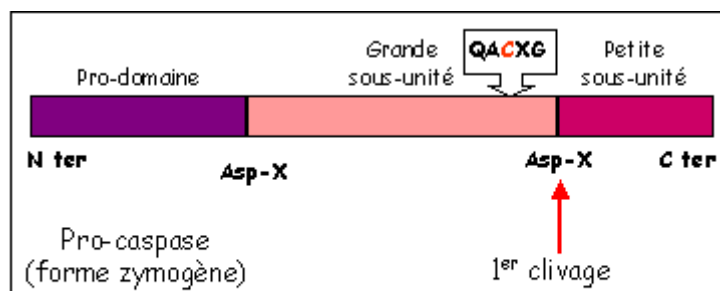


Figure 17 : Structure des caspases de mammifères.

QACxG constitue le site actif des caspases. Asp-X correspond aux sites de clivage conduisant à l'activation de la caspase. Adapté de (Couzinet *et al.*, 2002).

Le pro-domaine N-terminal de taille variable est à l'origine d'un mode d'activation particulier qui a permis une classification des caspases. Ainsi, on distingue :

- **Les caspases à pro-domaine long** sont dites **initiatrices**. Elles contiennent des motifs d'interaction protéine-protéine et sont impliquées dans l'initiation du signal de mort. Pour les caspases 8 et 10, les domaines DED (*Death Effector Domain*) sont des structures qui permettent la liaison de la caspase à des molécules adaptatrices. Pour les caspases 1, 2, 4 et 9, les domaines CARD (*Caspase Recruitment Domain*) jouent un rôle dans l'interaction entre caspases ainsi qu'avec une grande variété de molécules adaptatrices ou régulatrices. Ces motifs d'interaction permettent un recrutement des caspases au sein de complexes protéiques de signalisation et une auto-activation.

- **Les caspases à pro-domaine court** (caspases 3, 6, 7, 14) sont dites **exécutrices**. Elles sont impliquées dans la transduction du signal de mort et sont responsables de l'autodestruction de la cellule durant la phase effectrice. Elles ne possèdent pas de domaine leur permettant d'être recrutées et de s'oligomériser.

Les caspases sont donc constituées de protéines initiatrices et effectrices, aboutissant à un fonctionnement dit en cascade (Thornberry et Lazebnik, 1998; Wolf et Green, 1999).

3.2. Modes d'activation des caspases.

La conversion d'une caspase inactive en une enzyme mature nécessite deux clivages protéolytiques successifs.

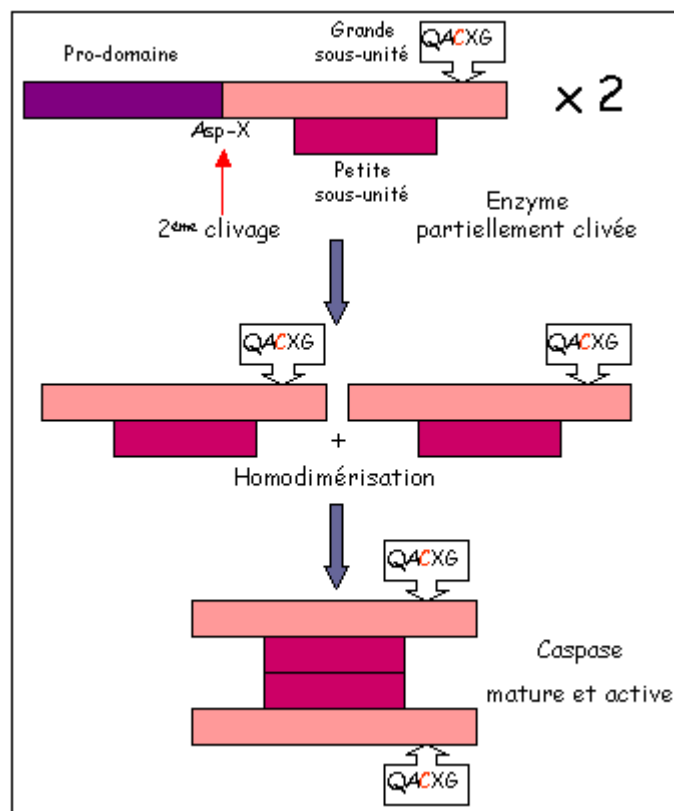


Figure 18 : Mécanisme d'activation des caspases.

Adapté de (Couzinet *et al.*, 2002)

Cette protéolyse se fait de manière séquentielle, une première coupure a lieu entre la grande sous-unité p20, et la petite p10 (figure 17), puis une seconde coupure libère le pro-domaine de la grande sous-unité (figure 18). La caspase va pouvoir s'assembler sous sa forme active. L'enzyme mature est un tétramère composé de 2 hétérodimères eux-mêmes issus de l'association de 2 sous-unités (p20/p10) et possède donc deux sites actifs (Walker *et al.*, 1994). Tous les sites de maturation sont de type Asp-X, et peuvent donc être reconnus par les caspases. Les mécanismes d'activation des caspases doivent être extrêmement régulés compte tenu des conséquences qui pourraient résulter d'une activation inopinée de ces protéases, à savoir la mort cellulaire (Kumar, 1999)

3.2.a. Activation auto-protéolytique induite par des protéines adaptatrices.

3.2.a.i. Caspases initiatrices à motif DED (exemple de la caspase-8).

Les mammifères ont développé une voie de MCP impliquant la famille du récepteur au TNF (Ashkenazi et Dixit, 1998). La fixation du ligand (Fas ligand, TNF) à un récepteur (Fas/Apo-1/CD95, TNF-R1) présent à la surface des cellules induit l'homotrimérisation du complexe ligand/récepteur (figure 19). Ces récepteurs transmembranaires possèdent dans leur portion intracellulaire une région conservée appelée le « domaine de mort » (*DD : death domain*).

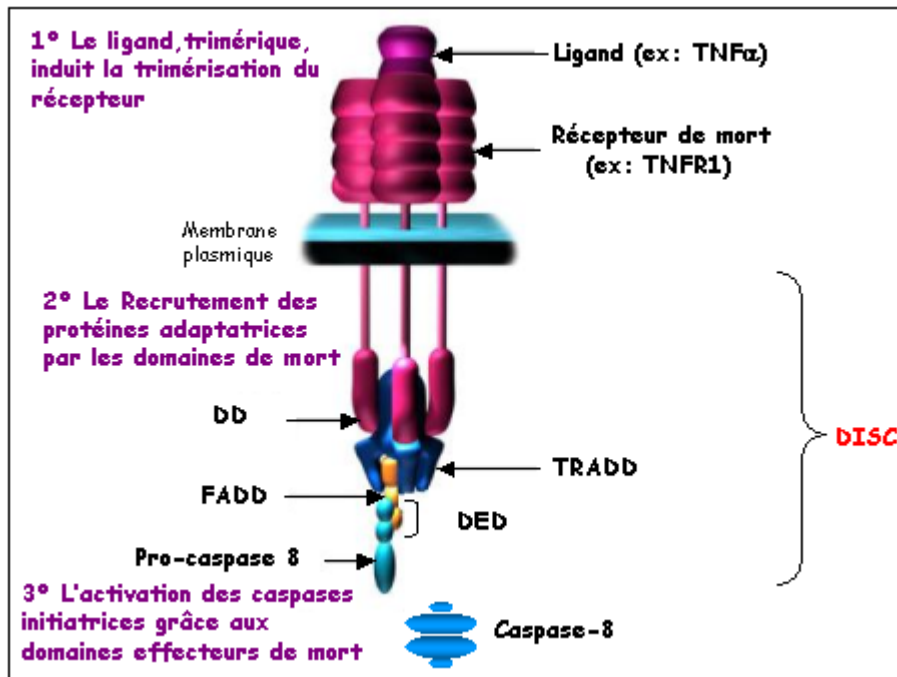


Figure 19 : Activation des caspases par les récepteurs membranaires de mort. Formation du DISC.

DD : Death Domain, DED : Death Effector Domain, DISC: Death Inducing Signalling Complex, FADD: Fas Associated Death Domain, TRADD: TNF-R1 Associated Death Domain. D'après <http://www.sghms.ac.uk/depts/immunology>.

Ces domaines intracellulaires deviennent alors capables de recruter, grâce à des protéines adaptatrices (FADD, TRADD..) (Boldin *et al.*, 1996; Muzio *et al.*, 1996) et par l'intermédiaire des DED, plusieurs molécules de pro-caspase-8. Le complexe multiprotéique ainsi formé à la membrane a été appelé le **DISC** (*Death Inducing Signaling Complex*) et génère une grande concentration locale en zymogène (Krammer, 2000). Il semble que le rapprochement des pro-caspases-8 dans le DISC provoque un changement conformationnel permettant leur clivage réciproque, et ce malgré la faible activité intrinsèque des pro-caspases. Les pro-enzymes s'auto-activent mutuellement ce qui permet la libération des formes actives de la caspase-8 dans le cytosol, lesquelles activeront, également par clivage, d'autres caspases effectrices (Ashkenazi et Dixit, 1998; Kischkel *et al.*, 1995).

Ce type d'activation est particulièrement important dans le système immunitaire (Yeh *et al.*, 1999). L'expression du ligand Fas est restreinte aux lymphocytes T cytotoxiques (LTc) et Natural Killer (NK) activées (figure 20).

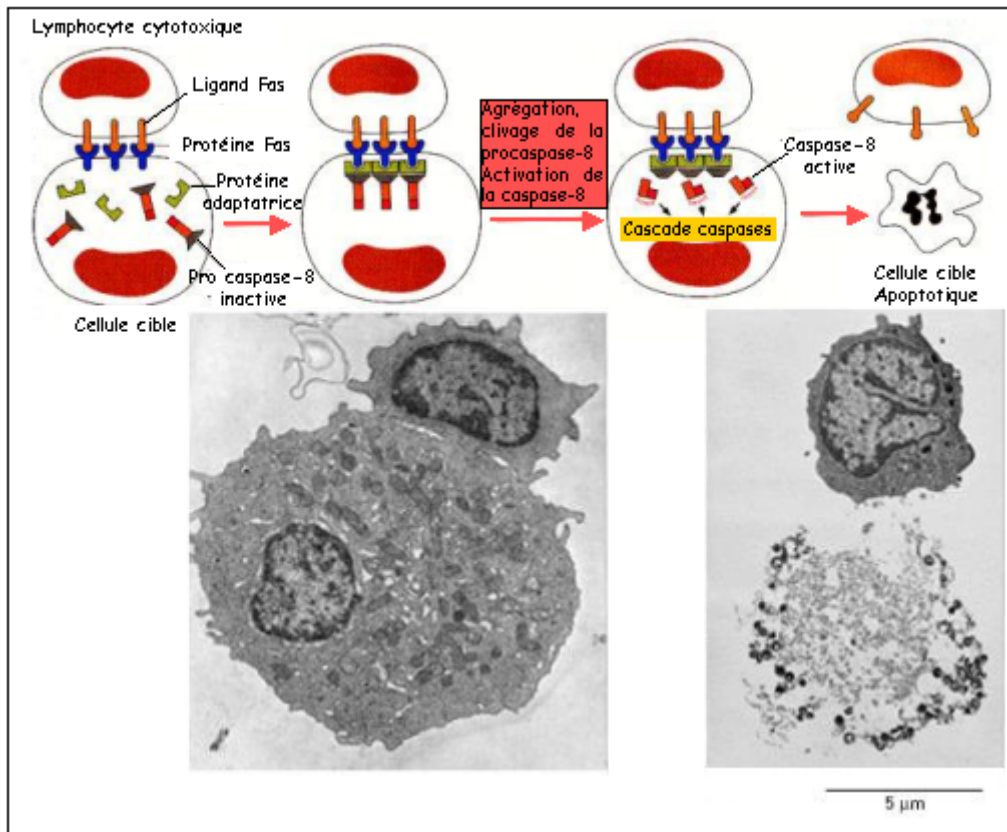


Figure 20 : Induction de la mort par apoptose d'une cellule tumorale par un lymphocyte cytotoxique, médiée par la voie Fas. Le schéma, au-dessus des photos, représente la formation du DISC et l'activation de la pro-caspase-8. Adapté de Molecular Biology of the cell 3ème édition.

Le LTC peut induire l'apoptose d'une cellule cible par la liaison de Fas à son ligand, cela a pu être étudié dans au moins trois cas bien caractérisés :

- L'élimination des lymphocytes activés, à la fin de la réponse immunitaire.
- L'élimination des cellules infectées par des virus ou des cellules tumorales par les cellules T cytotoxiques et les cellules NK.
- L'élimination des cellules inflammatoires dans des sites immunopriviliés (œil et testicules).

3.2.a.ii. Caspases effectrices à motif CARD (exemple de la caspase-9) .

L'activation auto-protéolytique de la pro-caspase-9 est induite par la formation d'un complexe associant : dATP, Apaf-1 (homologue de l'activateur Ced-4), cytochrome *c*, et procaspase-9 (homologue de Ced-3) (Budihardjo *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1997 ; Liu *et al.*, 1996).

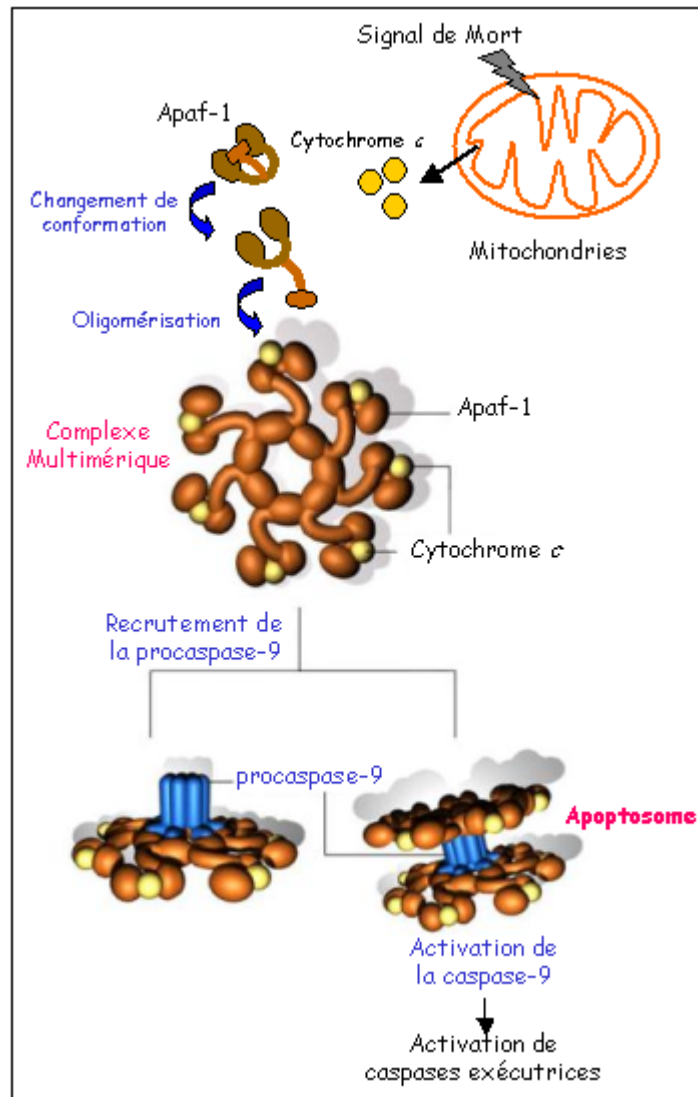


Figure 21 : Activation de la caspase-9 au niveau de l'apoptosome.

Modifié d'après <http://www.sghms.ac.uk/depts/immunology>

Apaf-1 est une protéine adaptatrice, elle s'associe avec la pro-caspase-9 par l'intermédiaire du domaine CARD, présent dans les deux protéines, et avec le cytochrome c grâce à la présence de son domaine « WD rich ».

Le clivage protéolytique de la pro-caspase-9 n'a que peu d'effet sur son activité enzymatique, celle-ci passe donc par son association avec les 2 co-facteurs protéiques, Apaf-1 et le cytochrome c. Cette association est stable et c'est ce complexe appelé **apoptosome** qui représente l'enzyme active (figure 21). Apaf-1 (Zhou *et al.*, 1999) et le cytochrome c ne sont donc pas seulement des activateurs de la pro-caspase-9, ils constituent des sous-unités régulatrices de ce qui peut être considéré comme une holoenzyme ou apoptosome. C'est ce complexe multiprotéique formé qui est à l'origine du clivage, et donc de la formation de la forme active de la pro-caspase-9.

3.2.b. Activation protéolytique par une autre caspase.

Cette stratégie d'activation est typique des processus en cascade et est requise pour l'activation des caspases effectrices 3, 6, et 7 (Slee *et al.*, 1999). La caspase-9 active pourra par exemple, activer les pro-caspases-3 et 7 (Li *et al.*, 1997).

3.3. Les substrats des caspases.

Une fois activées, les caspases sont donc capables de se cliver entre elles, ce qui permet une amplification du signal de mort. La caspase-3 peut cliver les caspases 2, 6, 8 et aussi 9, la caspase-9 active les caspases-3 et 7, la caspase-8 active les caspases 3, 6, et 7. Cependant, les caspases ont d'autres substrats, une centaine de protéines impliquées dans différentes fonctions cellulaires ont été identifiées. Cela a permis de comprendre certains des changements morphologiques observables lors de l'apoptose. Nous allons citer quelques-unes de ces protéines cibles :

- Des protéines **nucléaires**. La nucléase CAD (*Caspase-Activated DNase*) pré-existe dans la cellule sous la forme d'un complexe inactif entre la sous-unité catalytique et une sous-unité inhibitrice ICAD. Le clivage de ICAD par la caspase-3 se traduit par la libération de la sous-unité catalytique active de CAD responsable du clivage de l'ADN (Enari *et al.*, 1998). L'électrophorèse, en gel d'agarose, de l'ADN d'une cellule apoptotique fait apparaître un profil caractéristique dit en "barreaux d'échelle" venant du fait que la fragmentation de l'ADN se produit préférentiellement dans la région internucléosomique. La CAD permet la libération de fragments oligonucléosomiaux typiques de l'apoptose car multiples de 180-200 paires de bases (pb) (Nagata, 2000; Wyllie *et al.*, 1980; Wyllie *et al.*, 1984) (figure 22), ce clivage peut être estimée par une technique sensible qui consiste à marquer les extrémités 3' des fragments d'ADN. Le système DeadEnd™ Fluorimetric TUNEL puis une analyse en microscopie de fluorescence permet de détecter les noyaux présentant une fragmentation de l'ADN (Wu *et al.*, 2000).

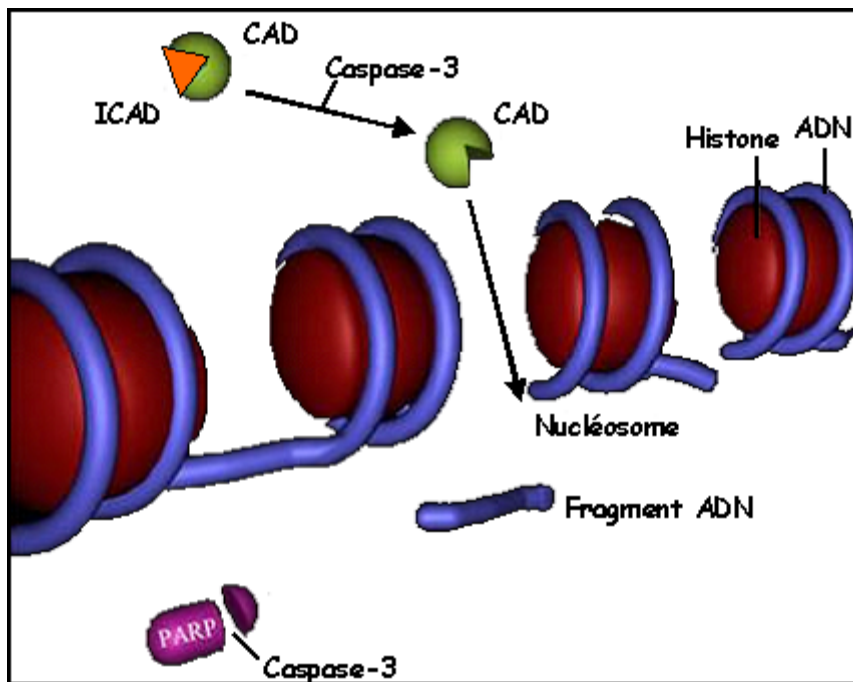


Figure 22 : Fragmentation internucléosomique de l'ADN par la nucléase CAD.

La protéolyse d'ICAD par la caspase-3 active la DNase CAD responsable de la fragmentation inter-nucléosomique de l'ADN nucléaire. La PARP intervient dans la réparation de l'ADN et est clivée au cours de la MCP par la caspase-3. Modifié d'après <http://www.sghms.ac.uk/depts/immunology>.

La terminale deoxynucleotidyl transférase rTdT peut catalyser l'incorporation de nucléotides d-UTP couplés à la fluorescéine aux extrémités 3'OH des fragments d'ADN générés lors du programme de mort cellulaire. Cette fragmentation de l'ADN des cellules apoptotiques correspond à une étape finale de la mort cellulaire et est consécutive, des modifications morphologiques nucléaires : bourgeonnements, et condensation chromatinienne (figure 23).

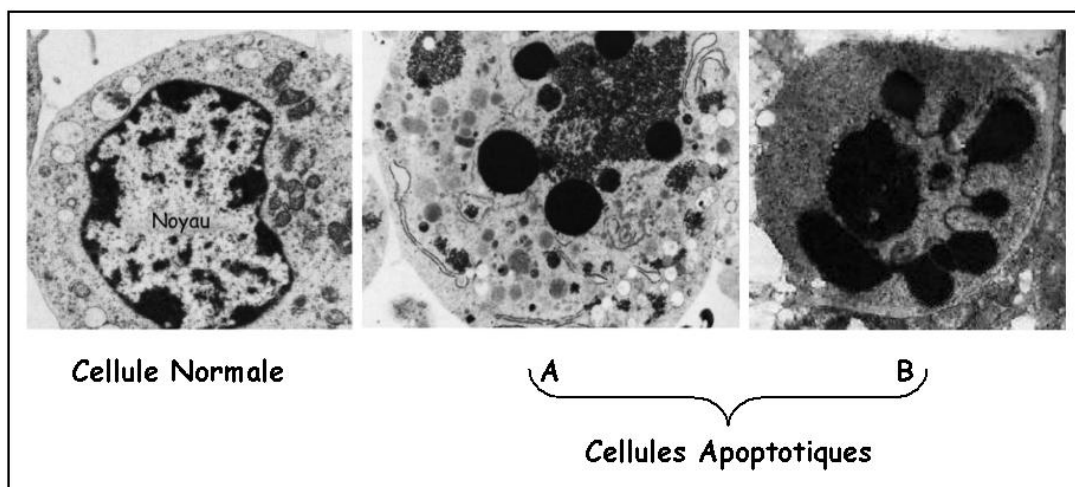


Figure 23 : Cellules normale et apoptotiques observées en microscopie électronique.

Les photos A et B de cellules en apoptose, illustrent les phénomènes de condensation chromatinienne et de bourgeonnements nucléaires.

A la différence de l'apoptose, la paraptose s'accompagne d'une absence de fragmentation inter-nucléosomale de l'ADN malgré une condensation de la chromatine. Lors de la mort cellulaire autophagique, les dommages nucléaires sont toujours précédés de la dégradation du contenu cytoplasmique.

La protéine Acinus (Sahara *et al.*, 1999), qui ne possède pas d'activité nucléase, est activée par la caspase-3 et est impliquée dans le processus de la condensation de la chromatine. La désorganisation du noyau ainsi que les phénomènes de bourgeonnement des corps nucléaires sont dus à la destruction du réseau formé par les lamines nucléaires, protéines également substrats des caspases.

- Une protéine impliquée dans la **réparation de l'ADN** : PARP (Poly ADP-Ribose polymérase), est une enzyme nucléaire, mais aussi le substrat des caspases 3 et 7 activées durant la MCP (figure 22). Ces protéases clivent la PARP (113kD) en fragments d'approximativement 89 kD et 24 kD. La détection du fragment de 89 kD, par un anticorps anti-PARP, sert de test d'apoptose et se révèle être un marqueur précoce de la MCP.

- Des protéines de la **structure cellulaire**. (Earnshaw *et al.*, 1999), notamment les protéines du cytosquelette : actine, gelsoline, fodrine (Kothakota *et al.*, 1997). Le clivage de la fodrine et de p21-activated kinase-2 permet la dissociation entre la membrane plasmique et le cytosquelette. Le clivage par la caspase-3 de la gelsoline provoque la formation des corps apoptotiques, et celui de la protéine ROCK1 est impliquée dans les phénomènes « de blebbing » (Sebbagh *et al.*, 2001). Ces modifications aboutissent à la perte de la forme de la cellule, à son démantèlement, nécessaires à sa phagocytose (Stroh et Schulze-Osthoff, 1998).

- Des protéines kinases, au moins 13 sont clivées durant la MCP. Les fragments activés par clivage sont pro-apoptotiques (Cardone *et al.*, 1997 ; Datta *et al.*, 1997a ; Ghayur *et al.*, 1996 ; Lee *et al.*, 1997; Widmann *et al.*, 1998).

- Des protéines impliquées dans les voies de transduction, dans l'expression des gènes, dans la régulation du cycle cellulaire, la prolifération etc.... (Earnshaw *et al.*, 1999)

3.4. Les inhibiteurs des caspases: antidotes de la mort !

Afin d'éviter une activation inopinée des caspases, des molécules inhibitrices de ces protéases sont contenues dans les cellules.

- Les **IAP** (*Inhibitors of Apoptosis Proteins*). Chez les baculovirus, une famille de gènes qui codent de puissants inhibiteurs des caspases, appelés IAP, a été mise en évidence. Chez l'homme au moins 5 protéines ont été identifiées : cIAP-1 (Rothe *et al.*, 1995), cIAP-2, XIAP (Liston *et al.*, 1997 ; Uren *et al.*, 1996), NAIP (Liston *et al.*, 1996), et la survivine. Leur surexpression inhibe la mort induite par des stimuli internes ou externes. Les IAP cellulaires, à part la survivine, présentes un ou plusieurs domaines BIR (*Baculovirus IAP Repeat*), leur permettant de se lier directement aux caspases afin de les inhiber. La famille des IAP a pour fonction de bloquer les processus de mort : même à des stades relativement avancés, les IAP peuvent bloquer l'activation des pro-caspases, et inhiber l'activité des caspases matures. XIAP, cIAP-1, cIAP-2 inhibent les caspases 3, 7, et 9 mais pas les caspases 1, 6 et 8 (Deveraux *et al.*, 1998; Roy *et al.*, 1997). La fixation sur la caspase-9 dans l'apoptosome inhibe son activité pro-apoptotique (Srinivasula *et al.*, 2001).

- Ces protéines IAP peuvent également être inhibées par **Smac /DIABLO** (*Second mitochondria-derived activator of caspase/Direct IAP-binding protein with low pI*) (Du *et al.*, 2000; Verhagen *et al.*, 2000) et **HtrA2/Omi** (*Hight temperature requirment*) (Hegde *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2001). En temps normal, Smac/DIABLO est une protéine mitochondriale. Tout comme le cytochrome c, elle se retrouve dans le cytosol des cellules engagées dans un processus de mort, et se lie aux IAP, empêchant leur action protectrice, et permettant aux pro-caspases de s'activer (Liston *et al.*, 1996; Silke *et al.*, 2001) favorisant ainsi la mort cellulaire. HtrA2/Omi est localisée dans la mitochondrie mais également dans le noyau et le RE, de la même façon que Smac/DIABLO, elle est libérée de la mitochondrie suite à un stimulus de mort.

- Les protéines **Hsp70** et **Hsp 90** (Heat shock protein). La protéine chaperonne Hsp70 inhibe *in vitro* la formation de l'apoptosome en interagissant directement avec Apaf-1 au niveau des domaines CARD. La surexpression de Hsp70 empêcherait le clivage de la pro-caspase-3 (Saleh *et al.*, 2000).

- Les inhibiteurs viraux :

CrmA, protéine du virus de la vaccine, a un effet inhibiteur sur l'inflammation (Palumbo *et al.*, 1994), sa surexpression permet d'inhiber la mort induite par la privation en

facteur de croissance, Fas ligand ou le TNF (Gagliardini *et al.*, 1994 ; Tewari *et al.*, 1995), et elle inhibe l'activité protéolytique des caspases 1, 8.

p35, une des protéines du baculovirus, inhibe une grande variété de caspases (initiatrices, exécutrices, inflammatoires) mais à l'inverse de CrmA, n'exerce pas d'effets inhibiteurs sur le granzyme B.

Ces deux protéines virales sont des inhibiteurs enzymatiques de types compétitifs. Une fois activées par clivage, elles se lient aux caspases et évitent ainsi la protéolyse d'autres substrats (Komiyama *et al.*, 1994; Zhou *et al.*, 1997).

FLIP, (Irmeler *et al.*, 1997) identifié chez le virus de l'herpes (Garvey *et al.*, 2002) possède 2 domaines DD qui lui permettent d'entrer en compétition avec la pro-caspase-8 pour la fixation sur le domaine DED de la protéine adaptatrice FADD (figure 24) (Bump *et al.*, 1995; Hu *et al.*, 1997).

Les protéines **E8** issue du virus équin de l'herpes de type II, **MC159** et **MC160** toutes deux issues du virus *Molluscum contagiosum* utilisent une stratégie similaire à celle de FLIP afin d'inhiber la mort. Elles se lient aux pro-domaines des caspases-8 ou -10 et empêchent leur recrutement aux récepteurs de mort (Duckett *et al.*, 1996 ; Uren *et al.*, 1996).

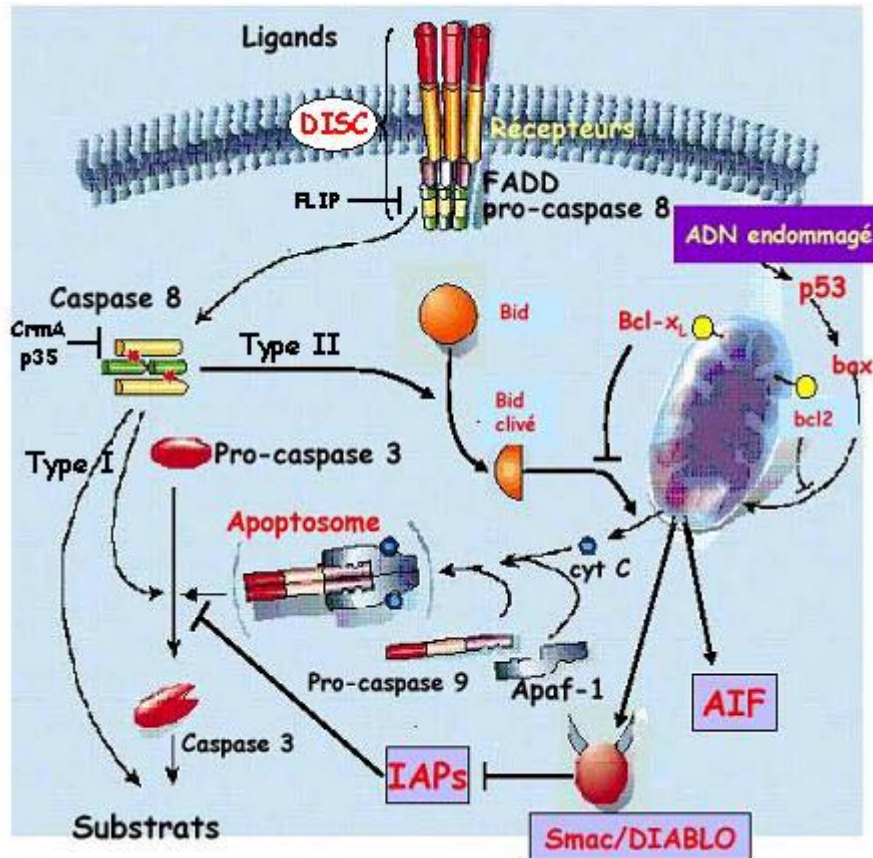


Figure 24 : Implication de différents acteurs moléculaires dans la voie des récepteurs de mort et dans la voie mitochondriale de la MCP.

Dans les cellules dit de type I: la caspase-8 va directement activer les caspases effectrices 3, 6, 7 qui vont cliver d'autres substrats en aval et induire la mort cellulaire. Dans les cellules dit de type II : l'activation des caspases effectrices, en particulier celle de la caspase-3 est indirecte et se fait par une boucle d'amplification mitochondriale. La caspase-8 clive Bid présent dans le cytosol, Bid clivé permet la libération de cytochrome c et ultérieurement l'activation de la caspase-9.

- Les inhibiteurs synthétiques.

Ils sont très utilisés pour l'étude des mécanismes moléculaires des voies de mort cellulaire. Ces inhibiteurs sont des pseudo-substrats des caspases. Les peptides Ac-DEVD-CHO sont des inhibiteurs réversibles des caspases-3. Le tripeptide inhibiteur z-Val-Ala-Asp-fluorométhylcétone (zVAD-fmk) pénètre facilement dans les cellules, se fixe irréversiblement au site catalytique des caspases, il a un large spectre d'inhibition, et intéresse toutes les caspases de type ICE (Schotte *et al.*, 1999).

3.5. Une voie de MCP indépendante des caspases.

3.5.a. Des preuves de son existence.

A quelques exceptions près, les caspases sont activées dans pratiquement toutes les MCP présentant une morphologie apoptotique. Cependant, l'utilisation d'inhibiteurs de caspases synthétiques a permis de montrer que les cellules peuvent mourir par des mécanismes ne nécessitant pas leur participation (Kitanaka et Kuchino, 1999).

La première démonstration claire d'une MCP indépendante des caspases fut rapportée par Johnson et ses collaborateurs (Johnson *et al.*, 1998). En effet des expériences de transfection transitoire de Bax dans des cellules (cellules~Bax) avaient montré, par immunocytochimie, sa localisation à la membrane de la mitochondrie et une redistribution du cytochrome *c* dans le cytosol. Ces cellules sont toutes engagées dans la mort puisque leurs noyaux sont condensés et fragmentés. La libération du cytochrome *c* coïncide avec l'apparition de la forme active de la caspase-3, et est suivie par la fragmentation nucléosomique de l'ADN. Le traitement de ces cellules~Bax par le zVAD-fmk prolonge leur survie : mais n'empêche pas leur mort. Les cellules traitées ont un noyau condensé mais pas fragmenté.

De la même façon, l'utilisation du zVAD-fmk ne parvient pas à sauver la lignée cellulaire Jurkat de la mort suite à la surexpression de Bax, bien que l'activation de la caspase-3 et la fragmentation nucléaire aient été bloquées. L'inhibition des caspases prévient l'apparition de la morphologie cellulaire typique de l'apoptose mais, la mort des cellules intervient malgré tout. Celle-ci est caractérisée par la présence de vacuoles cytoplasmique et par une condensation partielle de la chromatine. Bax peut activer un programme indépendant des caspases qui correspond à une forme non-apoptotique de mort cellulaire et qui dépend en partie du type cellulaire. McCarthy et collaborateurs ont ensuite démontré que la mise en place de cette forme de mort indépendante des caspases n'était pas une spécificité de Bax (McCarthy *et al.*, 1997).

Bien que les cellules soient traitées au zVAD-fmk, qu'il n'y ait pas de clivage des substrats de caspases, de condensation de la chromatine ou de fragmentation internucléosomique de l'ADN en réponse à des stimuli de mort, elles présentent toujours d'autres caractéristiques apoptotiques.

Le noyau a une forme irrégulière, il est partiellement condensé, le RE est dilaté, la cellule se condense, un bourgeonnement apparaît à la surface et les cellules ainsi traitées ne peuvent être sauvées de la mort. Ces observations laissent sous-entendre que certains des marqueurs cytoplasmiques de l'apoptose peuvent être déclenchés par d'autres enzymes que les caspases à la différence des événements nucléaires qui nécessitent l'activité des caspases (Kitanaka et Kuchino, 1999). Par conséquent, les inhibiteurs de

caspase ne préviennent pas la libération cytosolique de cytochrome *c*, mais empêchent l'activation de la caspase-3 et la fragmentation nucléaire. Ils ne font qu'accorder un délai supplémentaire de vie à la cellule et en aucun cas ne peuvent contrarier à long terme la cytotoxicité induite par Bax. Ainsi, Bax et les membres de la famille Bax peuvent induire la mort des cellules par une voie indépendante des caspases (Rosse *et al.*, 1998).

3.5.b. La MCP-indépendante des caspases *in vivo*.

D'une façon majoritaire, la MCP indépendante des caspases a été identifiée *in vitro* sur des cellules en culture. Se pose alors le problème de savoir si ce type de mort cellulaire est une réalité physiologique. Le modèle *C.elegans* permet lui aussi de soutenir cette théorie. En effet, la MCP est bloquée chez un mutant « perte de fonction » pour *ced-4*, caspase activatrice, désignant cette protéine comme essentielle pour le processus de mort. Par ailleurs, la surexpression de *ced-4* chez un mutant *ced-3* réduit, mais ne bloque pas totalement, la mort des cellules. Ces résultats suggèrent que *ced-4* intervienne en amont de *ced-3* et que *ced-4* puisse induire la mort de cellules indépendamment de *ced-3* (Shaham et Horvitz, 1996) (figure 25).

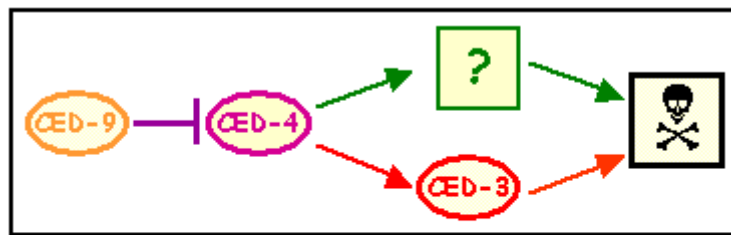


Figure 25 : Voie de mort cellulaire indépendante des caspases chez *C. elegans*.

La bifurcation des deux voies se ferait en aval de *Ced-4*. D'après Shaham et Horvitz, 1996.

Les produits des gènes *csp-1/-2A/-2B* récemment identifiés comme homologues de *ced-3*, pourraient être les protéases intervenant dans cette voie indépendante de *ced-3*. D'autres systèmes protéolytiques ou de dégradation pourrait également y participer.

Chez les mammifères, les preuves de l'existence de MCP indépendante des caspases sont encore quelque peu obscures. Toutefois quelques exemples nous permettent de l'envisager, la mort spontanée des spermatozoïdes ne semble pas requérir l'activation des caspases (Weil *et al.*, 1998).

Chez des animaux invalidés pour des caspases, peu de dégâts (ou des effets très tardifs) ont pu être constatés. La mort des cellules interdigitales chez l'embryon n'est pas affectée chez des souris invalidées pour *Apaf-1* ou lors de l'utilisation d'inhibiteurs synthétiques des caspases. La revue de Lockshin et Zakeri présente des exemples de voies n'impliquant pas les caspases (Lockshin et Zakeri, 2004b). Ils relèvent que si les caspases sont engagées durant l'embryogenèse alors il existe une certaine redondance

dans le matériel cellulaire assurant la mort. Les embryons semblent bien équipés pour garantir si besoin la mort des cellules par des voies alternatives.

Toutefois Borner et Monney nous "mettent en garde", et posent la question de savoir si suffisamment de preuves ont été accumulées pour affirmer qu'il existe une voie de mort indépendante des caspases (Borner et Monney, 1999). Les principales données sur lesquelles repose cette forme de MCP indépendante des caspases proviennent d'expériences où des inhibiteurs artificiels des caspases ont été utilisés. Or nous ne pouvons pas exclure que des caspases encore non-identifiées soient résistantes à ces drogues, nous ne pouvons pas non plus être certains que ces inhibiteurs soient suffisamment stables à l'intérieur des cellules.

3.5.c. Des candidats pour la servir.

Si une voie indépendante des caspases est une des stratégies de la cellule pour mourir, quels sont alors les candidats impliqués dans cette voie ? et comment en l'absence des caspases obtient-on le déclenchement puis à terme la mort de la cellule ? Les expériences réalisées avec le zVAD-fmk ont permis de constater que cet inhibiteur ne prévient pas la mort et ne bloque pas non plus les manifestations qui surviennent au niveau de la mitochondrie. Ainsi, la chute du $\Delta\Psi_m$, la production de ROS ou encore la libération extramitochondriale des effecteurs de la mort comme le cytochrome c et l'AIF sont toujours observés lors de l'inhibition de l'activité des caspases. Cette voie indépendante des caspases pourrait donc mettre à contribution la mitochondrie pour arriver à ses fins, à savoir la mort de la cellule.

Il est supposé que les protéines libérées en même temps des mitochondries puissent activer d'autres protéases telles des sérines protéases, granzyme B, cathepsines et calpaïnes. La surexpression de la sérine protéase HtrA2/Omi induit une MCP avec un phénotype inhabituel, similaire à celui de la paraptose. HtrA2/Omi inhiberait les IAP dans une voie dépendante des caspases, et participerait à une MCP indépendante des caspases par une activité sérine protéase.

Ces protéases tiendraient partiellement le rôle des caspases, et provoqueraient les mêmes modifications cellulaires, mais de façon moins efficace. Des publications impliquent d'ailleurs des protéases non-caspases dans la MCP (Wang, 2000; Williams et Henkart, 1994). Pour reprendre la métaphore de Borner et coll. (Borner et Monney, 1999), elles agiraient comme des ciseaux et non plus comme des haches pour couper les "liens de vie de la cellule" (figure 26).

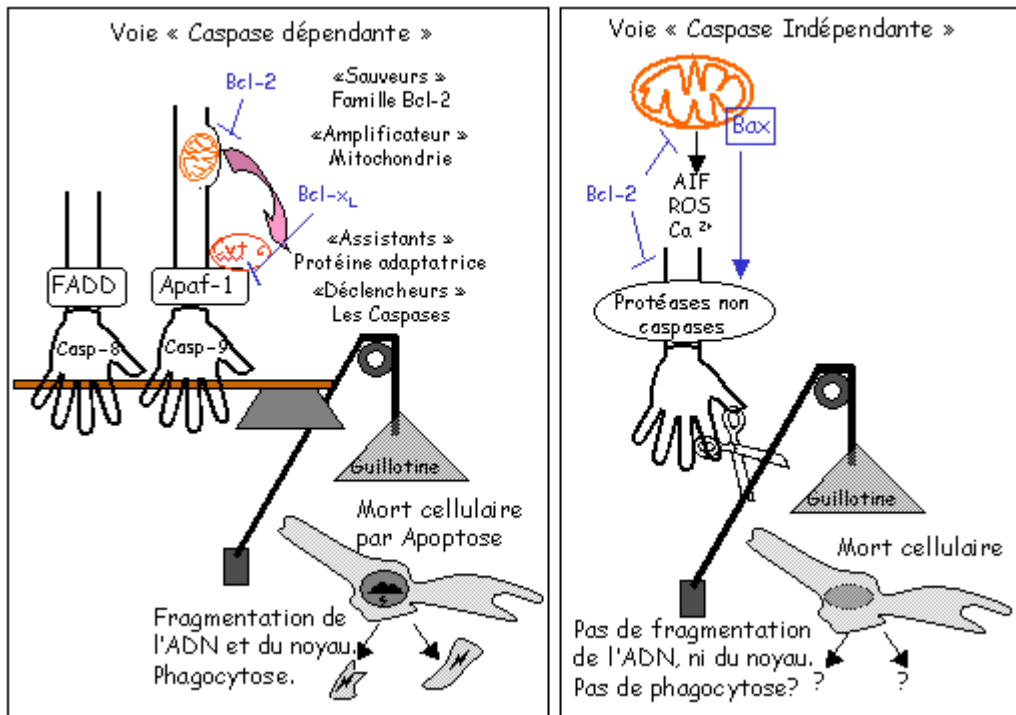


Figure 26 : Activation caspase dépendante et caspase-indépendante de la mort cellulaire (symbolisée par la guillotine).

Les organismes multicellulaires utilisent l'apoptose dépendante des caspases (encadré de gauche) pour éliminer les cellules superflues ou endommagées. Cette voie assure un clivage rapide et efficace du noyau et des structures cellulaires, les débris sont immédiatement phagocytés. Si les caspases sont absentes (cellules énucléées, caspases knock-out) ou bloquées (inhibiteur de synthèse zVAD-fmk, ou viraux p35) une mort cellulaire est aussi observée (encadré de droite). Les caractéristiques morphologiques de la cellule qui meurt sont différentes et les débris cellulaires ne sont pas nécessairement phagocytés. Des facteurs mitochondriaux (AIF, ROS, calcium, cytochrome *c*) peuvent être libérés dans le cytoplasme. La formation de canaux par oligomérisation de Bax pourrait induire cette libération. Cette voie de mort indépendante des caspases ferait intervenir d'autres protéases (sérine protéases, des calpaïnes ou des cathepsines). Cette voie peut être inhibée par l'intervention de la protéine Bcl-2. Adapté de (Borner et Monney, 1999).

3.5.d. Un dilemme, la libération de l'AIF.

Une polémique réside autour de la libération de l'AIF, qui semble tenir un rôle central dans la régulation des voies indépendante des caspases (Joza *et al.*, 2001). Certaines études rapportent que la libération du cytochrome *c* depuis la mitochondrie, mais pas celle de l'AIF, survient de façon indépendante des caspases. Ainsi, le cytochrome *c* stimulerait l'activation des caspases lesquelles déclencheraient la libération de l'AIF et de l'Endo G.

Mais d'autres résultats suggèrent que cette libération soit clairement indépendante de celle du cytochrome *c* et indépendante des caspases (Daugas *et al.*, 2000 ; Susin *et al.*, 1999). Dans cette optique, l'AIF peut être parfois libéré de façon dépendante des caspases, mais souvent de façon indépendante, ce qui suppose l'existence de plusieurs mécanismes permettant la libération mitochondriale de l'AIF et d'autres protéases de l'espace intermembranaire (Cande *et al.*, 2004).

➤ Lorsque les caspases interviennent dans la voie de transduction du signal de mort, elles interviennent en amont de la mitochondrie, et par conséquent de l'AIF : sa libération serait caspase-dépendante.

➤ Lorsque le signal de mort est caspase indépendant, et est conditionné ou dépendant de la perméabilisation de la membrane mitochondriale, alors la libération de l'AIF peut survenir indépendamment et parfois avant l'activation des caspases.

Une autre controverse concerne les mécanismes moléculaires de la libération mitochondriale de l'AIF. *In vitro*, des expériences indiquent que les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 formeraient seuls ou avec le VDAC des canaux spécifiques autorisant le passage du cytochrome c (16,6 kDa) mais pas celui de l'AIF (54 kDa). D'autres expériences contredisent ce modèle de tamis moléculaire, et suggèrent que des canaux composites formés par tBid, Bax et d'autres protéines mitochondriales forment des pores géants autorisant le passage de solutés jusqu'à 2000 kDa. Une autre hypothèse postule que la libération des protéines mitochondriales puisse survenir selon un processus en plusieurs étapes, nécessitant la perméabilisation, sans spécificité de taille moléculaire, en même temps que la désorption, cette fois spécifique, de protéines liées à la membrane interne. En effet, celle-ci est particulièrement riche en lipides chargés négativement comme la cardiolipine, et des interactions électrostatiques suffiraient à retenir le cytochrome c et l'AIF. Cette théorie expliquerait pourquoi, dans certaines situations expérimentales, l'AIF est libéré bien avant le cytochrome c et *vice versa*. Un degré de complexité supérieur peut encore être atteint si on entrevoit que la régulation de la libération des protéines peut résider dans l'existence de multiples compartiments submitochondriaux : espace inter-membranaire et espace compris entre les replis de la membrane interne formant les crêtes mitochondriales où par exemple se trouveraient 85% du cytochrome c. La micro-anatomie de la mitochondrie peut encore soulever bien des questions (Cande *et al.*, 2004).

4. Le calcium : un autre agent double !

Les ions Ca^{2+} sont impliqués dans de nombreux processus vitaux (fertilisation, exocytose, contraction musculaire, plasticité synaptique...)(Berridge, 1993) mais également dans la mort cellulaire (Fleckenstein *et al.*, 1974). Cette ambivalence du Ca^{2+} repose sur le contrôle précis de sa concentration cytosolique ($[\text{Ca}^{2+}]_c$). La concentration extra-cellulaire de Ca^{2+} libre est de l'ordre de 1 mM alors que la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ doit être maintenue à un niveau 10.000 fois plus faible ($\approx 10^{-4}$ mM) dans une cellule au repos. Les mitochondries mais surtout le réticulum endoplasmique (RE) constituent des réserves intracellulaires de Ca^{2+} servant à réguler la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (Rizzuto *et al.*, 1993). C'est pourquoi, une altération des membranes de ces organites ou de la membrane plasmique peut conduire à une élévation incontrôlée de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ provoquant la mort cellulaire (Berridge *et al.*, 1998 ; Leonard et Salpeter, 1979 ; Mattson et Chan, 2003).

4.1. Causes d'une augmentation de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ dans la MCP.

Consécutivement à un stimulus de mort le Ca^{2+} peut être libéré à partir du RE selon plusieurs modalités :

- Les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak peuvent s'insérer dans les membranes du RE générant une fuite de Ca^{2+} (Nutt *et al.*, 2002; Scorrano *et al.*, 2003).
- La caspase-8, activée par exemple par la protéine Fas, peut cliver une protéine transmembranaire du RE : la protéine BAP31 (Bcl-2 associated protein 31) (Annaert *et al.*, 1997). Le clivage de BAP31 par la caspase-8 génère un fragment p20 également à l'origine d'une fuite de Ca^{2+} (Breckenridge *et al.*, 2003).
- En plus de la formation de l'apoptosome, le cytochrome *c* libéré pourrait agir sur le récepteur de l'InsP₃ localisé à la membrane du RE provoquant une libération de Ca^{2+} (figure 28) (Furuichi *et al.*, 1989).

4.2. Conséquences d'une augmentation de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ dans la MCP.

Cette augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ peut être à l'origine de nombreuses perturbations du métabolisme cellulaire :

- La re-capture massive du Ca^{2+} par les mitochondries provoque une dépolarisation de la membrane mitochondriale, un arrêt des synthèses d'ATP et l'ouverture du PTP (Bernardi, 1999; Boehning *et al.*, 2003).
- Le recrutement à la mitochondrie de la protéine Drp-1 génère une fission mitochondrial (Breckenridge *et al.*, 2003). Cette fission mitochondriale s'accompagne d'une libération de cytochrome *c* (Jimbo *et al.*, 2003).

- L'activation d'endonucléases Ca^{2+} dépendante (Wyllie, 1980). En plus de CAD, il semblerait que d'autres nucléases puissent être spécifiquement activées par le Ca^{2+} au cours de l'apoptose (Kawane *et al.*, 2001).
- L'activation de la calcineurine qui est une phosphatase dépendante du Ca^{2+} et de la calmoduline. L'activation de la calcineurine provoque la déphosphorylation de Bad (protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2) qui est alors transloquée du cytosol vers la mitochondrie où elle stimule la libération de cytochrome *c* (Wang *et al.*, 1999).
- L'activation de la phospholipase A2 (PLA2) par le Ca^{2+} produit de l'acide arachidonique dont l'accumulation pourrait modifier la perméabilité membranaire mitochondriale (Gugliucci *et al.*, 2002; Obeid *et al.*, 1993).
- L'activation de cystéine protéases cytosoliques Ca^{2+} -dépendante de type calpaïnes (Suzuki *et al.*, 1987). La m-calpaïne (ou calpaïne II) activée par le Ca^{2+} est transloquée vers le RE où elle active par clivage protéolytique de la caspase-12 (Nakagawa et Yuan, 2000). Cette cascade n'a pas été décrite chez l'homme puisque la caspase-12 y est non fonctionnelle (Fischer *et al.*, 2002).
- Le calcium cytosolique peut induire une activité de type caspase-3 à l'origine d'effets apoptotique nucléaires (Juin *et al.*, 1998).

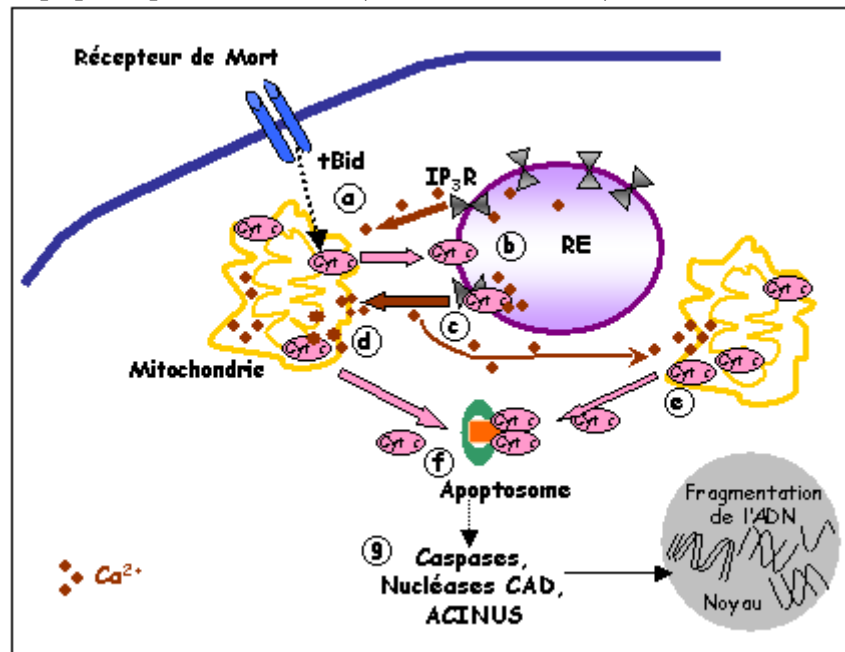


Figure 28 : Modèle de libération de calcium réticulaire par le cytochrome *c*.

Un stimulus de mort (ex : activation des récepteurs de mort) induit la libération mitochondriale du cyt *c* (a) qui diffuse vers le RE, se lie au récepteur IP_3 (b) et induit la libération du Ca^{2+} à partir du RE (c). Le Ca^{2+} relargué du RE provoque une augmentation rapide de la $[\text{Ca}^{2+}]$ cytosolique (d) lequel est capté par les mitochondries, ce qui amplifie le relargage de cyt *c* à partir des mitochondries (e). Le cyt *c* cytosolique permet également la formation de l'apoptosome (f) qui conduira à une cascade d'activation de caspases, et de nucléases qui finaliseront le processus de mort cellulaire en clivant des protéines et l'ADN (g). IP_3 : Inositol 1,4,5, triphosphate cytochrome *c* : cyt *c*. Adapté de (Mattson et Chan, 2003).

5. Phosphatidylsérine : mangez moi !

Pour que les corps apoptotiques soient reconnus comme des éléments à phagocyter, la cellule doit pouvoir se différencier des cellules avoisinantes et signaler son état apoptotique. Pour ce faire, la membrane plasmique se réorganise et exhibe des signaux de mort pro-phagocytaires, dit signaux « eat-me ». Un signal clairement établi est l'exposition des résidus phosphatidylsérine (PS) à la surface cellulaire, événement précoce des programmes de mort cellulaire. La membrane plasmique est constituée d'une double couche lipidique asymétrique, les 2 demi-couches ont des compositions différentes. Le cholestérol semble se répartir de manière équivalente sur les deux demi-couches, les glycolipides sont strictement retrouvés sur le feuillet externe de la membrane et enfin la composition en phospholipides diffèrent selon leur nature : la phosphatidylcholine se trouve plus facilement sur le feuillet externe, et la phosphatidylsérine préférentiellement sur feuillet interne (Fadok *et al.*, 1998; Fadok *et al.*, 1992 ; Schlegel et Williamson, 2001). L'aminophospholipide translocase est normalement responsable de cette distribution asymétrique de la PS et la scramblase est capable d'homogénéiser la distribution des phospholipides entre les deux feuillets. Ainsi, le changement de localisation des molécules de PS, au cours du processus apoptotique, qui passent d'une orientation cytoplasmique à une orientation extracellulaire est le résultat de l'activité de ces 2 enzymes. L'aminophospholipide translocase est inhibée et la scramblase est activée (Schlegel *et al.*, 1996; Zwaal et Schroit, 1997). Il est intéressant de noter que l'activité de la scramblase dépend du Ca^{2+} alors que l'activité de l'aminophospholipide translocase est inhibée par le Ca^{2+} (Orrenius *et al.*, 2003). Enfin l'activité de l'aminophospholipide translocase dépend de l'ATP contrairement à celle de la scramblase (Balasubramanian et Schroit, 2003). Par ailleurs, si la cellule apoptotique se distingue de la population de cellules saines, il faut que les phagocytes "professionnels" de l'enlèvement des cadavres soient à même de reconnaître cette cellule condamnée. Il a été établi que les macrophages reconnaissent d'une manière très efficace les résidus PS par l'intermédiaire d'un récepteur stéréospécifique (Fadok *et al.*, 2000).

La détection des cellules apoptotiques peut être basée sur la modification topologique de ce phospholipide membranaire. L'annexine V présente une forte affinité pour les molécules de PS, la fixation de l'Annexin-V-Alexa 568 à la PS peut être observée en microscopie de fluorescence. Ce test traduit la translocation de ce phospholipide du feuillet interne de la membrane plasmique vers le feuillet externe. L'observation révèle donc une externalisation de la PS.

Les glycoprotéines membranaires des cellules apoptotiques sont modifiées, et pourraient participer également à l'identification de la cellule à éliminer. Des lectines seraient leurs récepteurs à la surface du phagocyte (Duvall *et al.*, 1985).

V. Mort cellulaire et pathologies.

La MCP est une fonction physiologique essentielle pour la construction, la maintenance, la défense et la réparation des tissus. C'est pourquoi, un dysfonctionnement des voies d'exécution de la MCP peut conduire à l'apparition d'anomalies du développement et/ou à des pathologies sévères. Des liens étroits entre le dérèglement des processus de mort cellulaire et l'apparition des pathologies chez l'homme ont été mis en évidence. La liste des pathologies qui semblent impliquer un dysfonctionnement direct ou indirect de la mort cellulaire ne cesse de s'allonger (tableau 2).

Tableau 2 : Maladies associées à un dérèglement des programmes de mort cellulaire.

+ Suractivation, - Inhibition

PATHOLOGIES	EXEMPLES	MORT CELLULAIRE
Maladies neurodégénératives	Alzheimer	+
	Sclérose latérale amyotrophique	+
	Parkinson	+
	Chorée de Huntington	+
Désordres immunitaires	Maladies autoimmunes	-
	SIDA	+
	Diabète	+
	Thyroidite	+
Néoplasies	Lymphome	-
	Astrocytome	-
	Hépatome	-
	Mélanome	-
Divers	Rejet de Greffe	+
	Hépatites fulminantes virales	+
	Chocs toxi-infectieux	+
	Accidents Vasculaires Cérébraux	+

Deux types de dysfonctionnement peuvent être distingués :

➤ Ceux qui conduisent à une inhibition de la mort cellulaire programmée. Ils permettent l'apparition de cellules néoplasiques, et contribuent au développement d'incidents prolifératifs tel que les cancers (Thornberry et Lazebnik, 1998).

➤ Ceux qui génèrent un excès de mort cellulaire programmée. Ils sont responsables de dommages dans des tissus sains, et peuvent contribuer à l'apparition de pathologies de type dégénérative.

Enfin, sans qu'un dysfonctionnement de la MCP ne soit directement à leur origine, il existe un certain nombre de pathologies dans lesquelles un stress "primaire" (infection virale ou bactérienne, épisode hypoxique...) engendre une activation des voies d'exécution de la MCP provoquant l'endommagement des tissus. C'est le cas au cours d'un choc septique, ou pour les cellules cardiaques lors d'un infarctus du myocarde, ou pour des cellules nerveuses lors d'un accident vasculaire cérébral. Dans ces exemples beaucoup de cellules meurent par nécrose, et d'autres meurent par apoptose.

1. Le cancer.

Le cancer est une maladie caractérisée par un déséquilibre entre division et mort cellulaire. Etant donné que la durée de vie augmente, et que le traitement des maladies infectieuses et cardiovasculaires ne cesse de s'améliorer, il est vraisemblablement voué à devenir la maladie fatale la plus courante dans le monde industrialisé.

1.1. Cancer et apoptose.

La transformation cancéreuse a longtemps été associée exclusivement aux proliférations cellulaires. Cependant, les altérations génétiques, ainsi que l'entrée anormale dans le cycle cellulaire nécessaire à la prolifération, provoquent le plus souvent l'autodestruction de la cellule mutée. Par conséquent, il apparaît qu'un blocage préalable de la MCP est la condition *sine qua non* à l'émergence d'une prolifération cellulaire incontrôlée et constitue un facteur important de carcinogenèse (figure 29).

La résistance à la MCP des cellules tumorales humaines peut provenir de :

❖ La surproduction ou de l'activation constitutive de protéines anti-apoptotiques.

Bcl-2 : Une étude concernant les lymphomes B folliculaires (hémopathie lymphoïde maligne) indique que, dans 85% des cas, il existe une translocation chromosomique t (14;8) (q32;q21) plaçant le gène de bcl-2 sous le contrôle du promoteur du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines sans interrompre la région codante (Tsujiimoto *et al.*, 1984). En conséquence la protéine Bcl-2 est constitutivement activée et induit la survie des cellules du lymphome (Chao et Korsmeyer, 1998). L'activité oncogénique de Bcl-2 dans cette situation provient de ses propriétés anti-apoptotiques, mais il a aussi été démontré que la sur-expression de Bcl-2 n'était que l'un des événements associés à la prolifération lymphoïde. Pour obtenir une transformation maligne il est nécessaire d'avoir des altérations génétiques additionnelles.

Des expériences *in vivo* montrent la nécessité d'une surexpression de l'oncogène myc, Bcl-2 et myc agissant en synergie pour induire une transformation maligne (Strasser *et al.*, 1990).

c-IAP2 : c-IAP2 appartient à la famille des protéines inhibitrices de l'apoptose qui inactivent les caspases. La translocation chromosomique t (11;18) (q21;q21) génère des transcrits fusionnés entre c-IAP2 (en 11q21) et MALT1/MLT (*Mucosa Associated Lymphoid Tissue Lymphoma Translocation gene 1*) (en 18q21) (Uren *et al.*, 2000).. La protéine chimère résultant de cette translocation active NF-κB qui contribue à l'induction du gène c-IAP-2 amplifiant ainsi l'effet anti-apoptotique. Ces lymphomes du MALT se développent dans les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses.

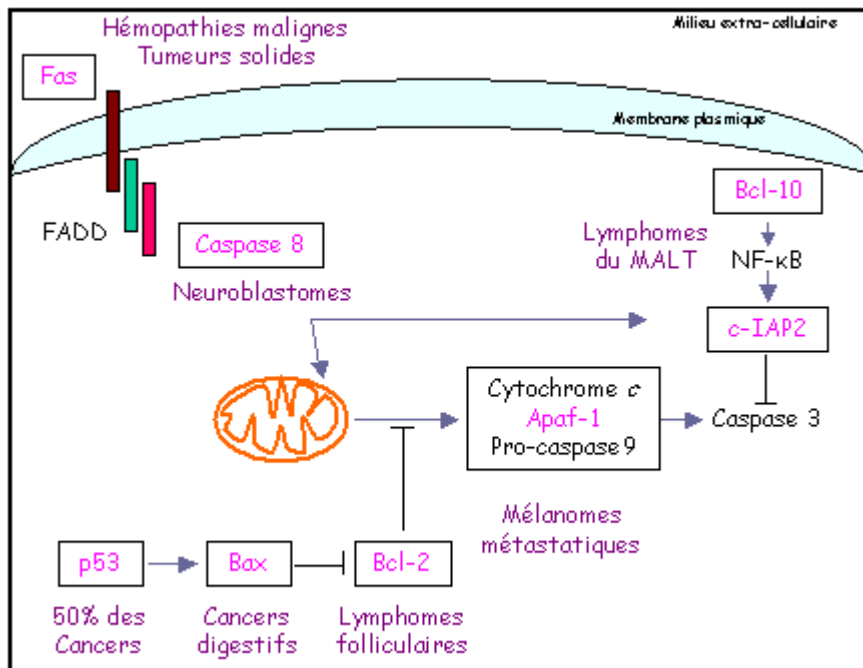


Figure 29 : Mutations somatiques des gènes impliqués dans le contrôle de la mort cellulaire dans les tumeurs humaines. Les protéines dont la mutation somatique a été identifiée dans des cellules tumorales sont représentées en rose. Les principales tumeurs dans lesquelles ces mutations ont été identifiées sont indiquées à proximité. Adapté de (Solary *et al.*, 2002).

❖ **L'inactivation de protéines pro-apoptotiques.**

Fas : De par ses fonctions pro-apoptotique, la voie Fas est impliquée dans la régulation du système immunitaire. Le dysfonctionnement de cette voie de mort aboutit à l'apparition de désordres lymphoprolifératifs et à des cancers hématopoïétiques. Des mutations du gène Fas ou, de ses effecteurs ont été retrouvés chez des patients présentant des myélomes, des lymphomes non-Hodgkinien et d'autres cancers (Landowski *et al.*, 1997; Nagata, 1999) (figure 29).

Bax : Des formes mutées de Bax par décalage du cadre de lecture (ajout ou délétion d'une désoxyguanine dans l'exon 3 du gène) sont retrouvées dans plus de la moitié des cancers gastro-intestinaux, du moins ceux chez qui s'accompagnent une instabilité des microsatellites (Rampino *et al.*, 1997), et dans la plupart des lymphomes à instabilité microsatellitaire (Inoue *et al.*, 2000).

Bax Ψ est une forme restreinte aux tumeurs d'origine gliale (24% des tumeurs) présentant une délétion dans la région N-terminale par rapport à la forme principale Bax α . Bax Ψ est localisé à la mitochondrie et semble posséder un pouvoir pro-apoptotique supérieur à Bax α . La présence de Bax Ψ est corrélée avec une augmentation de la survie des patients atteints de glioblastomes multiformes (Cartron *et al.*, 2002).

Apaf-1 : L'expression du gène Apaf-1 est dérégulée par hyperméthylation de son promoteur (Soengas *et al.*, 2001). Cette modification a été identifiée dans les mélanomes malins métastatiques. Cette méthylation induit l'inactivation de la voie de signalisation de l'apoptose dans les cellules tumorales, comme le fait la mutation Bax (Solary *et al.*, 2002).

Caspase-8 : Des mutations somatiques du gène de la caspase-8 ont été associées à des carcinomes gastriques (Soung *et al.*, 2005), des neuroblastomes (Takita *et al.*, 2001) des cancers du cou et de la tête (Mandrizzato *et al.*, 1997). L'inactivation du gène de la caspase-8 par méthylation a également été retrouvé dans des neuroblastomes, elle confère aux cellules malignes une résistance à l'apoptose, induite par l'engagement d'un récepteur à domaine de mort (Fas ou TNF-R1), ce qui entraîne la résistance des cellules aux lymphocytes T (Teitz *et al.*, 2000).

❖ **L'inactivation de protéines contrôlant l'expression de gènes de la MCP.**

p53 : L'inactivation de protéines suppresseurs de tumeur peut induire la résistance à l'apoptose dans les cancers humains (Jaattela, 1999; Johnstone *et al.*, 2002; Leist et Jaattela, 2001) (figure 29). La protéine p53 est une protéine nucléaire essentielle au contrôle de la progression du cycle cellulaire, de la réparation de l'ADN et de l'apoptose induite par de nombreuses agressions cellulaires. De nombreux gènes impliqués dans la MCP (Bax, Bcl-2...) sont des cibles de la p53. La protéine p53 est mutée dans la moitié des tumeurs humaines (60 à 70% des cas pour le cancer du colon), et la plupart des mutations sont retrouvées dans le domaine de liaison à l'ADN (Hollstein *et al.*, 1991 ; Levine, 1997).

NF- κ B : Le facteur de transcription NF- κ B réside normalement dans le cytoplasme en interaction avec son inhibiteur. Sous l'action de cytokine ou de facteurs de croissance NF- κ B est transloqué dans le noyau où il se lie à l'ADN et active l'expression des gènes anti-apoptotiques et pro-métastatiques (Chaudhary *et al.*, 2000). L'activation constitutive de NF- κ B est une cause importante de résistance à l'apoptose dans les cellules tumorales (Lu *et al.*, 2004).

1.2. Cancer et autophagie cellulaire.

Les données concernant les liens entre cancer et autophagie cellulaire, peuvent apparaître contradictoires. Une augmentation de l'autophagie cellulaire a été décrite dans différents types de cancers humains, de même qu'une inhibition de cette autophagie peut être associée à certaines tumorisations. L'autophagie étant une forme de mort cellulaire programmée, la réduction de cette activité peut logiquement augmenter la prolifération de cellules cancéreuses. D'autant plus que l'autophagie est responsable de "l'enlèvement", et de la digestion d'organites cellulaires défectueux. Des mitochondries endommagées, dépolarisées ou des portions de réticulum endoplasmique, peuvent engendrer la production de radicaux oxydés qui sont susceptibles d'augmenter le taux basal de mutations. La destruction de ces structures cellulaires internes par autophagie est un moyen de limiter les lésions génotoxiques causées par ces oxydants. Par conséquent, une réduction de l'autophagie pourrait augmenter le stress oxydatif et permettre l'accumulation d'altérations géniques multiples.

A l'inverse, la séquestration sélective de mitochondries dépolarisées dans des vacuoles autophagiques empêche la libération cytoplasmique de facteurs pro-apoptotiques (cytochrome c, AIF), et par conséquent permet à une cellule cancéreuse d'échapper à la MCP. Par ailleurs durant la progression tumorale, les conditions d'oxygénation et les nutriments sont limités tant que la vascularisation de la tumeur n'est pas bien assurée. Les cellules cancéreuses peuvent survivre à ces conditions de stress (privation de nourriture et hypoxie) par l'activation de l'autophagie cellulaire. La tolérance de la cellule cancéreuse à ces privations est très variable selon l'origine des tumeurs. Dans certains cancer du colon, les cellules cancéreuses sont capables de survivre à de longues périodes de privation d'éléments nutritifs et présentent un taux important d'autophagie. (Ogier-Denis et Codogno, 2003; Okada et Mak, 2004).

Le taux d'expression des protéases lysosomales n'est pas non plus étranger à la progression tumorale, il est même inversement corrélé, en général, à l'agressivité des tumeurs qui s'avèrent avoir un mauvais pronostic. La protéine de choc thermique Hsp-70 stabilise la membrane lysosomale, conférant à la cellule tumorale une certaine résistance à la mort faisant intervenir les enzymes lysosomales.

2. Le SIDA.

Les virus n'ont cessé, au cours de l'évolution, de développer des stratégies pour manipuler, à leurs fins, la machinerie cellulaire de leurs hôtes. Ils peuvent réguler la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire (Yoshida, 2001). Certains virus inhibent les programmes de mort cellulaire de la cellule hôte et peuvent ainsi se multiplier avant que la cellule infectée ne meure (Everett et McFadden, 1999). Pour ce faire, ils peuvent par exemple produire des protéines qui se lient de manière spécifique aux caspases et bloquer leurs activités (Hawkins *et al.*, 1996 ; Nogal *et al.*, 2001).

A l'inverse, chez les personnes infectées par le VIH-1, la déficience immunologique qui accompagne la maladie a été attribuée à l'activation non appropriée des programmes de mort de plusieurs populations cellulaires (Ameisen *et al.*, 1995). La stratégie qu'utilise le VIH-1 afin de se répliquer et d'anéantir la réponse immune innée ou acquise de la cellule hôte, est d'activer l'apoptose. La destruction du système immunitaire est particulièrement prononcé au niveau des cellules T (helper) CD4⁺, lesquelles sont éliminées spécifiquement par le virus. Mais le VIH-1 peut aussi déclencher la mort de lymphocytes CD4⁺ non infectés, de même que celle de cellules qui ne sont pas des cibles du virus (neurones, myocytes..) (Badley *et al.*, 2003). Ce virus interférerait dans les voies de signalisation intracellulaire qui régulent l'apoptose, mais également dans les voies de signalisation inter-cellulaire puisque des cellules non infectées meurent par apoptose.

Les lymphocytes T CD4⁺ infectés par le virus expriment à leur surface une forte quantité de récepteurs Fas/CD95, et montrent, *in vitro*, une sensibilité plus importante à la mort cellulaire impliquant la voie CD95. La mort de ces lymphocytes est induite, *in vitro*, par les agonistes des anticorps anti-CD95, et/ou par le ligand soluble CD95 (Baumler *et al.*, 1996; Estaquier *et al.*, 1995). Pourtant, des travaux ont démontré que le VIH-1 n'éliminait pas les lymphocytes par une apoptose Fas-dépendante, ni même plus généralement, par la voie impliquant la famille des récepteurs au TNF. Ces résultats ont été appuyés par l'absence d'une activation précoce de la pro-caspase-8 en caspase-8, ce qui confirme le non-engagement des « récepteurs de mort », dans la mort cellulaire médiée par le VIH.

L'infection par le VIH-1 des cellules T CD4⁺ activées induit une MCP avec pour phénotype un rétrécissement de la taille des cellules, une translocation de la phosphatidylsérine, une chute de potentiel transmembranaire associée à une perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie libérant le cytochrome c et l'AIF (Petit *et al.*, 2002). L'utilisation de l'inhibiteur zVAD-fmk ne permet pas d'inhiber la mort des cellules T CD4⁺ infectées par le VIH-1, ce qui laisse suggérer la mise en route d'un programme de mort cellulaire indépendant des caspases.

Toutefois, les caspases semblent impliquées dans la dégradation de l'ADN et donc dans l'apparition du phénotype apoptotique du noyau (Petit *et al.*, 2002).

Il semble que la voie mitochondriale soit requise pour induire l'apoptose durant l'infection du VIH-1. Il a été montré une augmentation de l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax, et sa relocalisation au niveau mitochondrial. Cette localisation de Bax à la membrane mitochondriale est dépendante de l'infection virale puisqu'un inhibiteur de la réplication virale interdit ce phénomène dans des cellules infectées par le VIH-1. Même en présence de zVAD-fmk, les travaux montrent une chute de potentiel mitochondrial transmembranaire, considérée comme associée à l'ouverture du pore de perméabilité de transition (PTP) et à la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie (Badley *et al.*, 2003; Petit *et al.*, 2002).

3. Les maladies dégénératives.

Dans ce type de maladie, des niveaux importants de morts cellulaires sont observés (Anglade *et al.*, 1997). Chez la drosophile, dans un modèle de dégénérescence rétinienne, l'utilisation d'un inhibiteur viral des caspases a pu prévenir la perte de cellules nerveuses de la rétine et conserver la vision (Davidson et Steller, 1998). Ce résultat est important car cette maladie, qui, à terme aboutit à la cécité ressemble beaucoup à celle rencontrée chez l'homme (maladie génétique retinitis pigmentosa). Par contre, toujours chez la drosophile, dans un modèle de la Chorée de Huntington, le même inhibiteur de caspase n'a pu empêcher la mort des cellules nerveuses (Jackson *et al.*, 1998). Dans cette maladie, le gène muté n'est pas impliqué directement dans le contrôle de la mort cellulaire, mais les neurones du striatum puis du cortex cérébral meurent par apoptose. La partie codante du gène de la protéine Huntingtine présente une expansion d'un motif répété (CAG)_n d'où un motif polyGLN. La protéine mutée Huntingtine présenterait une affinité réduite pour un partenaire cytoplasmique (Hip-1). Cela permettrait à Hip-1 de former un complexe avec une autre protéine cytoplasmique (Hippi). Ce complexe déclencherait l'activation de la caspase-8, et donc de la cascade des caspases (Gervais *et al.*, 2002). C'est parce que cette pathologie touche une voie dépendante des caspases que l'on teste des inhibiteurs, et ainsi la maladie semble pouvoir être quelque peu ralentie (Chen *et al.*, 2000).

RESULTATS

***Galig*, un nouveau gène humain emboîté dans le gène de la galectine-3 humaine, possède deux phases ouvertes de lecture traduites en deux protéines différentes de la galectine-3.**

Selon le dogme central de la biologie un gène suit une organisation linéaire, il est défini comme une entité codant pour un transcrit et traduit en une protéine. Cette notion a évolué et il est maintenant reconnu que les génomes eucaryotes contiennent des structures géniques complexes (Boi *et al.*, 2004). Ces structures sont décrites depuis longtemps chez les procaryotes et les virus où la compaction du génome implique l'utilisation des mêmes séquences nucléotidiques pour la traduction de plusieurs produits.

Selon Singer et Berg : « un gène eucaryote est une combinaison de segments d'ADN qui ensemble constitue une unité d'expression. L'expression mène à la formation d'un ou plusieurs produits spécifiques et fonctionnels qui peuvent être des molécules d'ARN ou des polypeptides. Chaque gène comprend un ou plusieurs segments d'ADN qui régulent la transcription du gène et donc son expression » (Singer et Berg, 1991). Ainsi, un gène peut transcrire un seul ARNm qui présentera deux ou plusieurs ORFs (phases ouvertes de lecture) traduisant des protéines plus ou moins différentes. Cette propriété nécessite l'utilisation de mécanismes d'initiation de traduction complexes tels que le « leaky scanning », les séquences *IRES*, le décalage de cadre de lecture, l'abandon de codon stop ou le saut de ribosome. D'autres modifications du message génétique correspondent à des mécanismes d'épissage alternatif, d'édition de l'ARNm ou l'utilisation de promoteurs multiples, mécanismes qui conduisent à la production de molécules différentes.

1. Le locus du gène de la galectine-3 (*LGALS3*) .

Le locus du gène de la galectine-3 illustre bien ce concept de structure génique complexe. Un second promoteur se trouve localisé dans l'intron 2 du gène (Raimond *et al.*, 1995) (figures 1 et 30). Ce promoteur interne (Pr.2) possède une activité promotrice plus faible que celle du promoteur proximal (Pr.1) mais est néanmoins capable de transcrire des ARNm différents de ceux produits par le promoteur principal (Pr.1).

Deux transcrits, une forme longue et une forme courte, issus de Pr.2 ont été détectés par RT-PCR dans différentes lignées cellulaires. Le séquençage a précisé que le "grand" ARNm présente son site d'initiation de transcription dans le second intron de la galectine-3 et s'étend de l'exon 3 à l'exon 6.

Le "petit" ARNm présente une délétion, par rapport au transcrit de plus grande taille, entre les nucléotides 95 et 389. Ces sites correspondent à des sites consensus donneur et accepteur d'épissage, indiquant la possibilité d'un épissage alternatif à l'intérieur de cet ARNm.

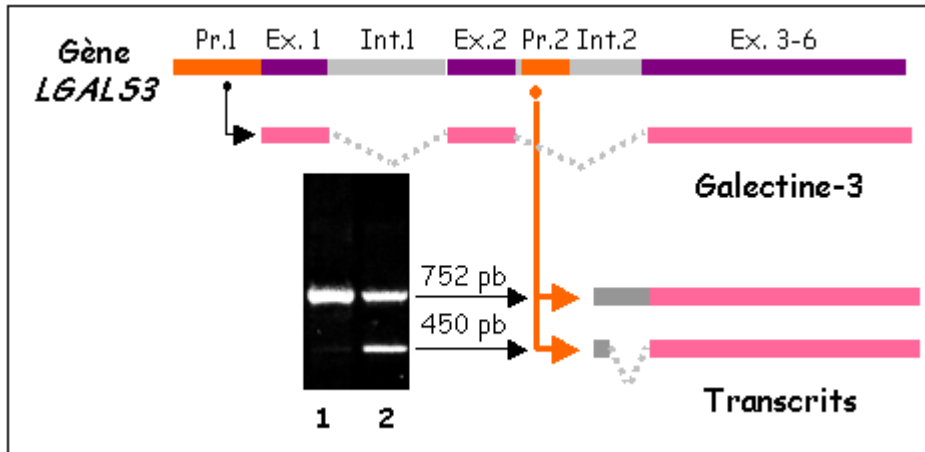


Figure 30 : Représentation schématique du gène de la galectine-3 et détection des transcrits issus du promoteur interne par RT-PCR.

(piste 1) ARNm extraits de la lignée cellulaire SVH-1, (piste 2) ARNm extraits d'une lignée de carcinome de colon. Le couple d'amorces utilisé amplifie un fragment de 752 pb pour la forme longue du transcrit de *galig*, et un second de 450 pb pour la forme la plus courte qui présente un épissage supplémentaire. (Adapté de Guittaut *et al* 2001). Pr. : promoteur (en orange), Ex. : exon (en violet), Int. : intron (en gris).

2. Un ARNm, deux ORFs et deux protéines exprimées : la mitogaligine et la cytogaligine.

Les transcrits issus de l'activité de Pr.2 partagent les séquences allant de l'exon 3 à 6 avec l'ARNm *LGALS3* (figure 31). Ils ne possèdent pas l'exon 2 qui contient le site d'initiation de traduction. En conséquence, aucun des 2 transcrits ne peut coder la galectine-3 entière. Ces transcrits possèdent deux ORFs différents et chevauchants. Les protéines potentiellement traduites présentent donc des séquences totalement différentes.

Des vecteurs d'expression mettant en phase chacune des ORFs avec le gène reporteur de EGFP ont démontré, lors d'expériences de transfection transitoire, que l'ARNm pouvait produire les deux protéines codées par les ORFs 1 et 2 (Guittaut *et al.*, 2001). L'observation des cellules transfectées, par microscopie de fluorescence, a permis de déterminer la localisation des protéines issues de l'expression des deux ORFs. La fluorescence associée à l'expression du plasmide pORF1-EGFP est plus ou moins diffuse et majoritairement cytosolique et nucléaire.

A l'inverse la fluorescence associée à l'expression du plasmide p ORF2-EGFP est clairement associée aux mitochondries et totalement exclue du noyau.

Le locus *LGALS3* contient donc 2 gènes chevauchants lesquels produisent des protéines entièrement différentes du fait de l'utilisation de cadres de lecture alternatifs. Le gène interne à la galectine-3 est dénommé **galig** (*galectine-3 internal gene*). La production à partir d'un seul ARNm de 2 protéines (**les galigines**) totalement distinctes issues de deux ORFs décalées et chevauchantes, reflète une compaction importante de l'information génétique (figure 31). Ces 2 protéines ont été dénommées **cytocaligine** et **mitocaligine** en rapport à leur localisation intracellulaire.

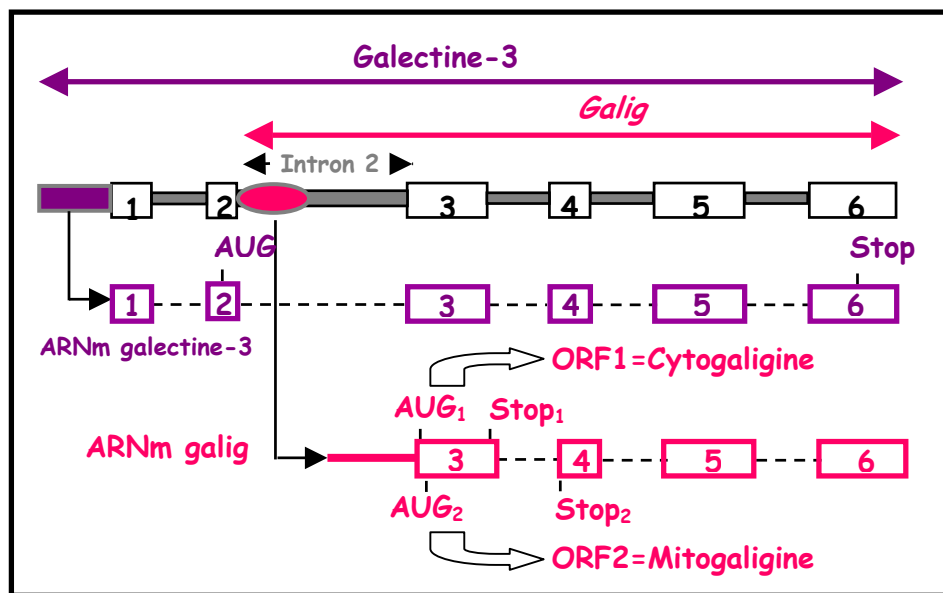


Figure 31 : Représentation schématique des gènes de la galectine-3 humaine et de galig.

LGALS3, localisé sur le chromosome 14 code la galectine-3 humaine. Le gène contient 6 exons (rectangles numérotés), le second contient le site d'initiation de traduction. Les introns sont représentés par les rectangles gris. Le gène interne à la galectine-3 (*galig*) a son promoteur (ovale rose) qui produit un ARNm initié à l'intérieur du second intron de *LGALS3*. Le transcrit ne code pas la galectine-3 mais des protéines alternatives (cytocaligine et mitocaligine) codées par 2 phases ouvertes de lecture chevauchantes (ORF1 et ORF2), (d'après l'article, chapitre 1).

Les recherches effectuées dans les banques de données n'ont pas permis de trouver, à ce jour, d'homologie de ces 2 protéines avec des protéines déjà existantes (figure 32 a et b).

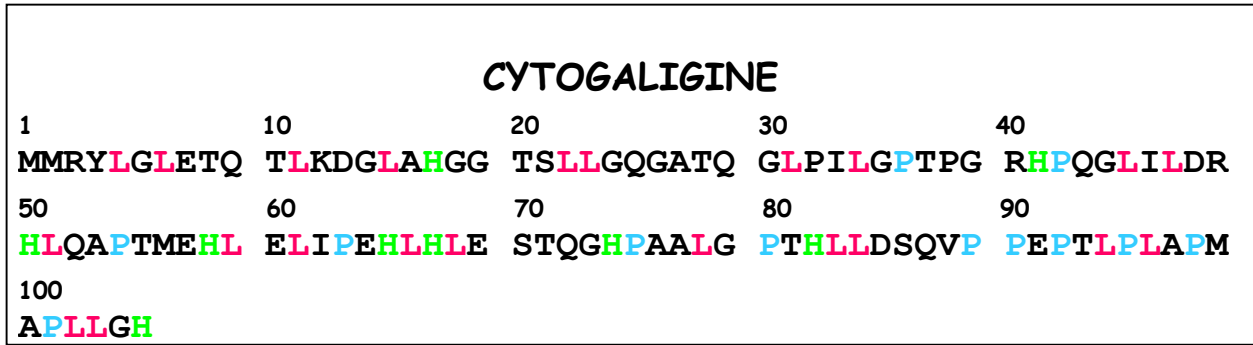


Figure 32 a : Séquence en acides aminés de la cytogaligine codée par le gène *galig*.

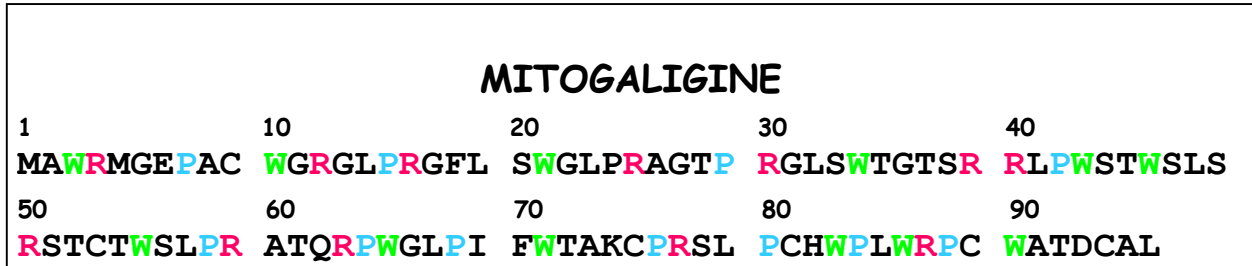


Figure 32 b : Séquence en acides aminés de la mitogaligine codée par le gène *galig*.

Tableau 3 : Caractéristiques de la cytogaligine et de la mitogaligine.

	Cytogaligine	Mitogaligine
Nombre d'acides aminés	106	97
Masse moléculaire apparente (en Dalton)	11,253	11,168
Caractéristiques et spécificités de la séquence primaire	20% Leucine 13% Proline 8,5% Histidine 12% Glycine Absence de Cystéine	12% Arginine 12% Proline 12% Tryptophane 18% résidus hydroxylés (9 Ser, 9 Thr) 6 Cystéines
Point isoélectrique à pH 7	6,6	11,6
	3 charges négatives	11 charges positives nettes

A la lecture du tableau 3, on remarque que la mitogaligine contient de nombreux résidus chargés, contraints et surtout un taux très fort de résidus tryptophane comparé au taux moyen observé dans les protéines naturelles (1,2%). Ce taux élevé de tryptophane confère à la mitogaligine des propriétés très hydrophobes, cohérentes avec sa localisation intracellulaire, puisqu'elle est associée aux membranes mitochondriales.

Par ailleurs, des similitudes de structures ou de composition en acides aminés sont retrouvées chez les peptides antimicrobiens capables d'interagir et de former des pores avec les membranes (Cramer *et al.*, 1995; Muchmore *et al.*, 1996; Schibli *et al.*, 2002; Shai, 1999). Certaines protéines effectrices de la mort cellulaire appartenant à la famille Bcl-2 sont connues pour partager des propriétés structurales avec ces peptides antimicrobiens.

3. Expression tissulaire différentielle des transcrits du gène *galig*.

L'activité de transcription du promoteur interne a été testée dans 24 tissus humains par RT-PCR (figure 33) (Guittaut *et al.*, 2001). Cette expérience a montré que les transcrits du gène *galig* sont abondants dans les leucocytes du sang périphérique, présents à un niveau moindre dans le cœur, les muscles, l'estomac, les testicules et retrouvés à un niveau beaucoup plus faible dans la rate, le foie, la glande surrénale, l'utérus, la peau et la moelle osseuse (Guittaut *et al.*, 2001). Le cœur et les muscles présentent la particularité de posséder les deux formes de transcrits (figure 33). Le faible niveau d'expression du gène *galig* dans les cellules de la moelle osseuse, comparé à celui retrouvé dans les leucocytes (formes matures), indique que la transcription semble dépendante de la différenciation cellulaire.

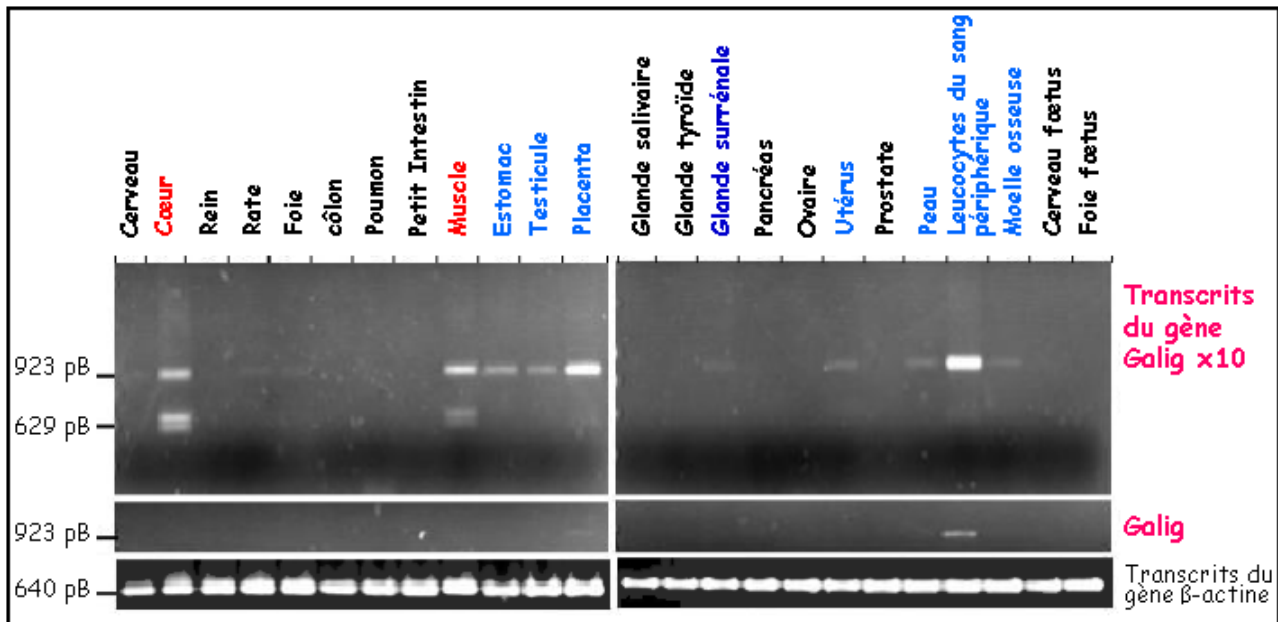


Figure 33 : Détection des transcrits de *galig* dans différents tissus humains.

Les amorces utilisées amplifient des fragments de 923 pb pour la forme longue du transcrite de *galig*, et de 629 pb pour la forme épissée. Les transcrits du gène de l'actine sont détectés à 640 pb. Les PCR ont été réalisées avec 0,25 ng ou 2,5 ng (x10) d'ADNc de *galig*. Adapté de (Guittaut *et al.*, 2001).

Il apparaît que l'expression de *galig* n'est pas ubiquitaire mais au contraire spécifique. D'autres résultats permettent d'affirmer qu'elle n'est pas non plus corrélée directement à celle du gène de la *galectine-3* humaine (Guittaut *et al.*, 2001). A l'heure actuelle, les mécanismes qui régulent l'expression de *galig* *in vivo* sont encore indéterminés.

4. Effets cellulaires induits par l'expression du gène *galig*.

Des cellules HOS (lignée cellulaire issue d'un ostéosarcome humain), ont été transfectées par le vecteur d'expression pORF2-EGFP qui produit la mitogaligine en fusion avec EGFP et la cytogaligine. Les cellules ont été ensuite observées en microscopie de fluorescence.

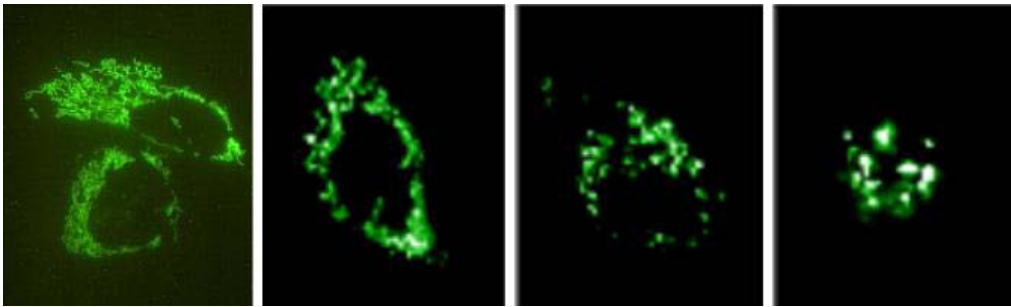


Figure 34 : Morphologie des cellules exprimant *galig*.

Cellules HOS observées en microscopie de fluorescence 24 heures après transfection transitoire d'un vecteur d'expression eucaryote codant à la fois mitogaligine-EGFP et la cytogaligine. Grossissement : X 320.

Les cellules transfectées présentent la localisation attendue de la protéine de fusion mitogaligine-EGFP, à savoir une fluorescence ponctiforme associée aux mitochondries. Certaines cellules semblent conserver un aspect morphologique presque normal (figure34, photo 1), une forme allongée, de petites ramifications, un noyau en position centrale et des mitochondries filiformes. Cependant, la majeure partie des cellules transfectées présentent une morphologie très altérée (photo 3 et 4), qui s'accompagne d'une condensation et d'une agrégation des mitochondries. Ces cellules se condensent, s'arrondissent, meurent et finissent par se détacher de la boîte de culture. Ces premières observations ont permis de révéler l'effet toxique résultant de l'expression de *galig*.

CHAPITRE 1 : *Galig* un nouveau gène humain inducteur de la mort cellulaire.

Les observations précédentes ont soulevé de nombreuses interrogations sur la fonction biologique du gène *galig* :

♣ Quels peuvent être les mécanismes et les médiateurs moléculaires qui gouvernent la toxicité induite par le gène *galig* ?

♣ Le processus de mort induit par *galig* est-il dépendant ou indépendant des caspases ? Requiert-il ou engage-t-il des protéines de la famille Bcl-2 ?

♣ De nombreuses voies moléculaires convergent vers la mitochondrie, est-ce que le mode d'action du gène *galig* implique lui aussi la mitochondrie ?

Dans ce premier chapitre sont décrits les observations qui montrent les propriétés cytotoxiques de *galig*. Ces résultats ont permis la rédaction d'un article dans *Experimental Cell Research* (2005). Cette publication montre également l'implication de la mitogaligine dans l'induction de la cytotoxicité médiée par *galig*, sans exclure pour autant la participation de la cytogaligine. L'expression de la mitogaligine induit la libération extramitochondriale de cytochrome *c*, protéine effectrice de la MCP, laquelle est significativement réduite par la co-expression de Bcl-X_L, protéine de la famille Bcl-2. L'antagonisme entre l'activité cytotoxique des galigines et celle anti-apoptotique de Bcl-X_L laisse supposer un lien entre les voies moléculaires empruntées par ces 2 protéines. Les premières études des relations structures/fonctions révèlent que l'adressage de la mitogaligine à la mitochondrie dépend d'une séquence interne, suffisante et nécessaire pour induire la libération de cytochrome *c* après transfection transitoire. Ce relargage de cytochrome *c* est aussi observé lors d'une interaction directe entre les mitochondries et des peptides dérivés de la mitogaligine.

I. Mise en évidence du caractère cytotoxique du gène *galig*.

Article: *Galig*, a novel cell death gene that encodes a mitochondrial protein promoting cytochrome *c* release.

Mélanie Duneau, Michaël Boyer-Guittaut, Patrick Gonzalez, Stéphane Charpentier, Thierry Normand, Martine Dubois, Jacques Raimond et Alain Legrand.

II. *Galig* et mort cellulaire programmée.

Dans la première partie de ce manuscrit nous avons insisté sur la déstabilisation des membranes mitochondriales qui constitue un des événements participant à l'exécution finale de la cellule. La perméabilisation de la membrane externe des mitochondries permet la libération d'effecteurs de morts qui participent à la cascade moléculaire aboutissant au démantèlement de la cellule. Plusieurs voies moléculaires passent par cette étape de perméabilisation. Les protéines de la famille Bcl-2 sont parmi les mieux caractérisées pour interagir avec la membrane mitochondriale externe et induire le relargage de facteurs pro-apoptotiques. Dans l'article, *galig* est décrit comme un gène cytotoxique inducteur de la mort cellulaire. Aucune homologie structurale n'est repérée avec les protéines de la famille Bcl-2. La mitogaligine, adressée à la mitochondrie est une protéine dont l'expression génère une libération du cytochrome *c* depuis la mitochondrie.

Au terme de la rédaction de cet article, même si nous avons identifié la fuite du cytochrome *c* comme marqueur moléculaire, nos observations ne permettent pas de proposer un mécanisme moléculaire retraçant le programme de mort cellulaire induit par *galig*. Les cellules exprimant *galig* perdent le contact avec les cellules voisines et se rétractent. Ce phénomène ne perturbe pas les cellules adjacentes qui conservent une morphologie normale. Nous avons donc essayé de déterminer si la mort cellulaire induite par *galig* pouvait présenter des caractéristiques similaires ou communes avec l'apoptose.

1. Modifications de la membrane plasmique.

Une cellule engagée dans un processus de mort doit signaler son état et se distinguer de la population des cellules saines. Elle change son identité en réorganisant sa membrane plasmique. Un signal clairement établi est le changement de localisation des molécules de phosphatidylsérine (PS) qui passent d'une orientation cytoplasmique vers une orientation extracellulaire. Cette modification de la répartition de la PS peut être étudiée par l'annexine V, une protéine qui se lie aux phospholipides de façon dépendante du calcium et qui possède une forte affinité pour la PS. L'exposition des PS est exploitée comme un marqueur et l'annexine V constitue une sonde spécifique pour la détection des cellules en apoptose (Vermes *et al.*, 1995).

Les cellules HeLa ont été transfectées de façon transitoire par les vecteurs d'expression eucaryote pORF2-EGFP codant la mitogaligine-EGFP et la cytogaligine ou pEGFP N3 codant EGFP.

Les cellules ont été incubées 24 heures après la transfection avec l'Annexin-V-Alexa 568 suivant le protocole établi par Roche Diagnostics (Roche Molecular Biochemicals Mannheim, Allemagne) puis observées en microscopie de fluorescence. La figure 4 B de l'article (chapitre 1, I) rend compte d'un marquage positif pour l'annexine V des cellules exprimant *galig*. Il convient de noter que les cellules positives se trouvent à un stade avancé dans le programme de mort puisqu'elles ont perdu les caractéristiques morphologiques de leurs origines tissulaires (absence de ramifications), elles sont arrondies et présentent une réduction importante de leur volume cellulaire. Ces cellules sont prêtes à se décrocher de la boîte de culture. L'expression de *galig* induit une translocation de la PS ce qui traduit une perte de l'asymétrie membranaire. Cependant, les cellules paraissent conserver l'intégrité de leur membrane plasmique lors de ce phénomène puisque des expériences révèlent que le colorant bleu trypan ne pénètre pas dans les cellules exprimant *galig* (non montré).

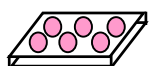
Une autre expérience a été réalisée afin de vérifier que les cellules transfectées par *galig* possèdent une membrane plasmique intègre. Des cellules ont été co-transfectées par un vecteur codant la mitogaligine fusionnée à la DsRED2 et un vecteur codant EGFP, protéine cytosolique et soluble. La présence de EGFP dans les cellules exprimant *galig* devrait témoigner de l'absence de fuite extracellulaire.

1.1. Matériel et méthodes.

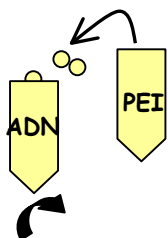
1.1.a. Culture cellulaire.

Les cellules HeLa sont cultivées à 37°C en atmosphère humide à 5% de CO₂ dans un milieu MEM 1X (Gibco BRL Life Technologies Inc., Rockville, MD, Minimum Essential Medium, NaHCO₃ 0.2%, L-alanyl-glutamine 2 mM, pénicilline 100 u/ml, streptomycine 100 µg/ml, pyruvate de sodium 1 mM, acides aminés non-essentiels 1 mM et SVF 10%). Les cellules HeLa sont mises en culture dans des boîtes 24 puits à raison de 4.10⁴ cellules par puits, 24 heures avant la transfection.

1.1.b. Transfection transitoire.

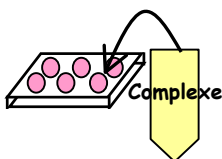


Pour chaque puits un complexe ADN/PEI (polyéthylèneimine) est réalisé comme suit :



► **Préparation du complexe** : 50 μ l de solution d'ADN (NaCl 9 ‰ : 40 μ l ; ADN plasmidique 10 μ l d'une solution à 200 μ g/ml = 2 μ g d'ADN/puits) sont ajoutés goutte à goutte sous agitation à 50 μ l de solution de PEI (NaCl 9 ‰, 45.5 μ l ; PEI 10 μ M, 4.5 μ l).

► **Formation du complexe** : le mélange est incubé 15 minutes à température ambiante.



► **Transfection des cellules** :

Addition de 100 μ l de complexe à 900 μ l de DMEM 1X sans SVF, 1% pénicilline/streptomycine.

Centrifugation des plaques de culture 5 min à 1500 tours/min.

Incubation 2 heures à 37°C en présence du complexe.

► **Elimination du complexe** et remplacement par 2 ml de milieu culture complet.

► Incubation des cellules dans les conditions standards jusqu'à analyse.

Les cellules sont co-transfectées par les plasmides pEGFP N3 (exprime EGFP seule) et pORF2-DsRED2, vecteur construit à partir de pORF2-EGFP où EGFP a été remplacé par DsRED2. Ce plasmide exprime la mitogaligine-DsRED2 et la cytogaligine.

1.1.c. Microscopie de fluorescence.

Les cellules sont observées 24 à 36 heures après la transfection au microscope inversé de fluorescence Axiovert 200M Zeiss. Le microscope est équipé de jeux de filtres permettant la détection :

- de EGFP (excitation BP 450-490, émission BP 515-565 ref.#10 Zeiss)
- de la DsRED (excitation BP 546/12, émission BP 575-640 ref.#20 Zeiss)

Le système de microscopie est couplé à une caméra permettant une acquisition grâce au logiciel AxioVision3.1 (Carl Zeiss Vision GmbH, Munich-Hallbergmoos, Allemagne).

1.2. Résultat.

Les cellules co-transfectées exprimant *galig* et EGFP, rendent bien compte des altérations morphologiques décrites précédemment. Les cellules, figure 35 photo CP, présentent la morphologie typique des cellules mortes, elles sont petites, rondes, les structures et les organites intracellulaires sont condensés et agrégés. La photo DsRED2 témoigne de l'agrégation des mitochondries, la fluorescence rouge étant associée à la mitogaligine fusionnée à la DsRED2. La photo EGFP montre que EGFP produite est restée confinée à l'intérieur de la cellule témoignant du fait que la membrane plasmique n'est pas endommagée.

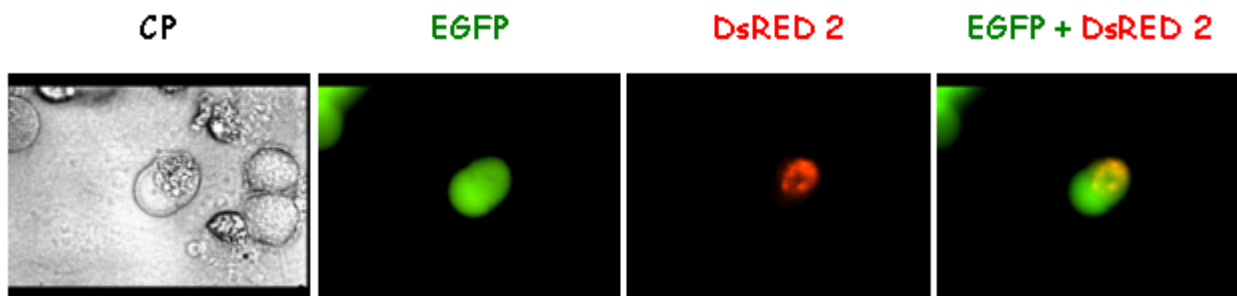


Figure 35 : Maintien de l'intégrité de la membrane plasmique lors de l'expression des galigines.

Cellules HeLa observées en microscopie de fluorescence 24 heures après co-transfection d'un vecteur d'expression, codant à la fois mitogaligine-DsRED2 et cytogaligine (pORF2-DsRED2) et d'un vecteur codant EGFP (pEGFP N3). Les cellules sont observées en contraste de phase (CP), pour l'expression de EGFP (EGFP), pour l'expression de la mitogaligine-DsRED2 (DsRED2). La colonne de droite représente la superposition des deux photographies EGFP + DsRED2. Grossissement : X 320.

2. Modifications nucléaires.

2.1. Condensation de la chromatine.

Lorsque la cellule a initié son programme de mort, le noyau est aussi le lieu de profonds bouleversements. La figure 4A de l'article (chapitre 1) nous permet de visualiser ces modifications nucléaires. Des cellules HeLa transfectées avec un vecteur d'expression eucaryote codant la mitogaligine-EGFP et la cytogaligine sont incubées avec du colorant Hoechst et observées 24 heures après la transfection en microscopie de fluorescence. Cette expérience nous permet de constater que l'expression de *galig* engendre une condensation de la chromatine, laquelle n'est pas observée dans les cellules transfectées par un vecteur codant EGFP.

2.2. Clivage de l'ADN.

Un autre critère de mort cellulaire par apoptose est la production de fragments d'ADN par des endonucléases activées lors de cette forme de MCP. Une première série d'expériences n'a pas permis de mettre en évidence le profil caractéristique dit en "barreaux d'échelles" de l'ADN des cellules apoptotiques, lors d'électrophorèse en gel d'agarose (non montré). Cependant, cette méthode n'est peut-être pas assez sensible dans la mesure où notre approche repose sur la transfection transitoire. Nous avons donc utilisé le test TUNEL qui permet d'analyser la fragmentation de l'ADN dans les cellules transfectées.

2.2.a. Test TUNEL®

Ce test permet de détecter et de quantifier de manière spécifique les cellules mortes par apoptose, à l'intérieur d'une population cellulaire, en mettant en évidence la fragmentation de l'ADN nucléaire. Le système DeadEnd™ Fluorimetric TUNEL (Promega Corporation, Madison, USA) marque l'ADN fragmenté en catalysant l'incorporation de nucléotides d-UTP couplés à la fluorescéine aux extrémités 3'OH de l'ADN en utilisant l'enzyme Désoxynucléotidyl Terminale Transférerase recombinante (rTdT). Les extrémités des fragments d'ADN ainsi marquées peuvent être visualisées par microscopie de fluorescence.

Cette technique a été appliquée à des cellules transfectées par les vecteurs codant les galigines.

2.2.a.i. Matériel et méthodes.

❖ Culture cellulaire et transfection transitoire.

Les cellules HeLa sont cultivées, mises en puits et transfectées, selon la méthodologie décrite dans le paragraphe précédent (chapitre 1, II.1.1.a), par les plasmides :

- pORF2-DsRED2 (exprime la mitogaligine-DsRED2 et la cytogaligine)
- pORF1-DsRED2 (exprime la cytogaligine-DsRED2 et la mitogaligine)

Les contrôles sont constitués par :

- des cellules non transfectées
- des cellules traitées à la DNaseI
- des cellules traitées à la staurosporine

❖ **Détection des fragments d'ADN.**

36 heures après la transfection :

Lavage 2 fois 5 minutes sous agitation au PBS

Fixation des Cellules ; 400 µl/puits de PFA 4%, 5 minutes à 37°C



Lavage 2 fois 5 minutes sous agitation au PBS

Perméabilisation des cellules ; 400 µl/puits PBS-SAB 2% Saponine 0,1%,
2 fois 5 minutes sous agitation



Lavage 2 fois 5 minutes sous agitation au PBS

Pré-équilibre ; 250 µl/puits Tampon d'équilibration (cf.fabricant)+Saponine 0,1%,
5 à 10 minutes, température ambiante



Marquage des extrémités clivées de l'ADN avec d-UTP fluorescéine ; 50 µl/puits de
solution d'incubation (cf. fabricant) + Saponine 0,1% + lamelles pour répartition
homogène dans le puits, 1 heure à 37°C, en chambre humide à l'abri de la lumière.



Retrait des lamelles

Arrêt de la réaction, 500 µl/puits de SSC 2X (voir notice fabricant)

15 min à température ambiante sous agitation



Lavages 3 fois 5 minutes sous agitation au PBS.

Analyse en microscopie de fluorescence.

Après l'étape de perméabilisation, les cellules qui constituent le témoin positif de l'expérience sont traitées à la DNase I (Promega). L'étape de pré-équilibre est effectuée avec le tampon de la DNaseI (40 mM Tris HCl pH 7.9, 10 mM NaCl, 6 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂) + Saponine 0,1%, dans les mêmes conditions que décrites dans l'organigramme. Les cellules sont incubées 10 minutes à température ambiante avec la Dnase I [1 unité/µl]. Après ce traitement, les cellules témoins subissent la suite des étapes du protocole en reprenant à l'étape de pré-équilibre.

2.2.a.ii. Résultat.

Les contrôles (figure 36 a) constitués des cellules non transfectées, traitées à la staurosporine ou à la DNase I permettent de valider la technique. Les noyaux des cellules apoptotiques apparaissent fluorescents.

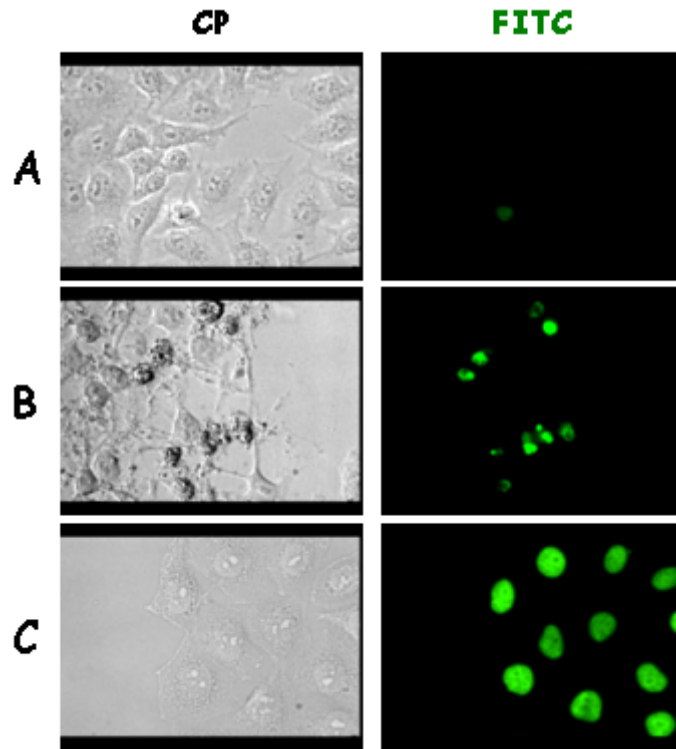


Figure 36 a : Effet TUNEL : contrôles positifs et négatifs.

Cellules HeLa non traitées (ligne **A**), ou traitées à la staurosporine (ligne **B**), ou à la DNase (ligne **C**) Les cellules sont observées en contraste de phase (**CP**) et en microscopie de fluorescence pour la fragmentation internucléosomique de l'ADN par la méthode TUNEL (colonne **FITC**). Grossissement : X 320.

Les cellules transfectées avec les vecteurs pORF2-DsRED2 (codant mitogaligine-DsRED2 et la cytogaligine) et pORF1-DsRED2 (codant cytogaligine-DsRED2 et la mitogaligine) ne présentent pas de noyaux fluorescents (figure 36 b). Les quelques cellules positives pour le marquage TUNEL ne sont jamais marquées en rouge et témoignent d'une apoptose spontanée.

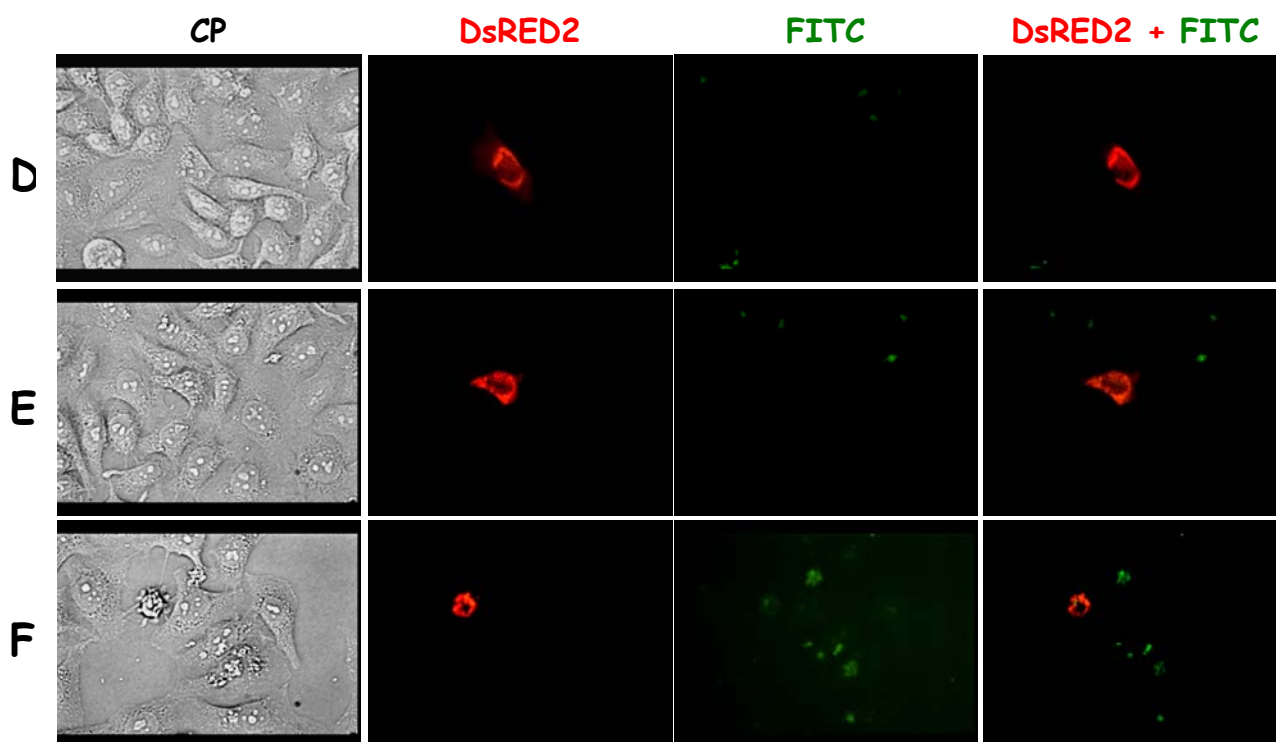


Figure 36 b : Absence du clivage de l'ADN, en fragments oligonucléosomaux, des cellules exprimant *galig*.

36 heures après transfection des cellules HeLa avec pORF1-DsRED2 qui code la cytogaligine-DsRED2 + la mitogaligine (ligne D), pORF2-DsRED2 qui code la mitogaligine-EGFP et la cytogaligine (lignes E, F), les cellules sont analysées en microscopie de fluorescence, pour l'expression des protéines (colonne DsRED2), et pour la fragmentation internucléosomique de l'ADN par la méthode TUNEL (colonne FITC). La colonne de droite représente la superposition des deux photographies DsRED2 + FITC et montre que les cellules positives pour DsRED2 sont négatives pour FITC. Grossissement : X 320.

La condensation des acides nucléiques ne semble pas suivie d'une dégradation de l'ADN libérant des fragments oligonucléosomaux typiques de ceux observés durant l'apoptose.

3. Altérations des mitochondries.

Des cellules HeLa et MCF-7 transfectées transitoirement avec un vecteur codant la mitogaligine-EGFP et la cytogaligine sont colorées au MitoTracker Red (MTR) et observées en microscopie de fluorescence. Dans les cellules non traitées, les mitochondries sont réparties dans tout le cytoplasme de la cellule et présentent un aspect de réseau filamenteux. La figure 2 de l'article (chapitre 1) révèle un changement dans la distribution de la fluorescence consécutif à la perte du réseau mitochondrial, ainsi l'expression de *galig* provoque une condensation et une agrégation des mitochondries donnant l'impression de mitochondries en amas.

4. Caractéristiques biochimiques.

4.1. Libération du cytochrome *c*.

Un des facteurs pro-apoptotiques libéré lors de la perméabilisation des mitochondries est le cytochrome *c*. La figure 7 de l'article (chapitre 1) établit que l'expression de *galig* induit une libération de cytochrome *c* dans des cellules humaines en culture. La mise en évidence de cytochrome *c* cytosolique montre la déstabilisation des membranes mitochondriales dans les cellules exprimant *galig*.

4.2. Activation des caspases.

Le relargage de cytochrome *c* conduit à la formation de l'apoptosome et à l'activation de la caspase-3. Différents tests permettent de déterminer si cette protéase a été activée.

4.2.a. Clivage de PARP.

La Poly ADP-ribose polymérase (PARP) est une enzyme nucléaire engagée dans la réparation de l'ADN. PARP est aussi le substrat des caspases 3 et 7 activées durant la MCP. Ces protéases clivent la PARP (113kD) en fragments d'approximativement 89 kD et 24 kD. La détection du fragment de 89 kD possible grâce à l'utilisation d'un anticorps anti-PARP se révèle être un marqueur précoce de la MCP.

4.2.a.i. Matériel et méthodes.

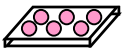
❖ Culture cellulaire.

Les cellules HeLa sont mises en culture dans des boîtes 6 puits à raison de $2 \cdot 10^5$ cellules par puits, 24 heures avant la transfection (chapitre 1, II.1.1.a).

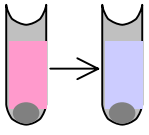
❖ Transfection transitoire.

Les cellules sont transfectées avec une quantité de 5 μ g d'ADN/puits. 200 μ l du complexe ADN/PEI sont ajoutés à 1,8 mL de DMEM 1X sans SVF (chapitre 1, II.1.1.a). Les cellules sont transfectées avec le plasmide pORF2-EGFP codant la mitogaligine-EGFP et la cytogaligine.

❖ **Détection de PARP.**



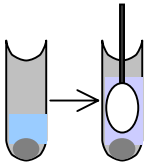
▶ 36 heures après la transfection, les cellules sont traitées avec 400µl de trypsine/EDTA.



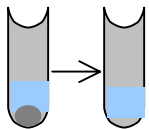
▶ Centrifugation des cellules 5 minutes à 1500 tours/min.

▶ Lavage dans 500 µl de PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM, Na₂HPO₄ 8mM, pH 7.4) et centrifugation 5 min à 1500 tours/min.

▶ **Lyse** : Incubation du culot cellulaire 30 minutes à 4°C dans 250 µl de solution de lyse (210 mM mannitol, 70 mM sucrose, 10 mM Hepes, 1 mM EDTA, pH 7.5, complété extemporanément avec 1‰ de PMSF 100mM dans éthanol, 1‰ DTT 1 M, 1‰ d'un mélange d'inhibiteurs de protéases (Sigma Aldrich, France)).



▶ Le lysat cellulaire est traité au **potter**.



▶ Centrifugation du lysat cellulaire 5 minutes, 4°C, 700g, le culot contient membranes et noyaux.

▶ **Récupération** des protéines cytosoliques après centrifugation 30 min, 4°C, 15000g.

▶ **Estimation de la concentration** en protéines dans les surnageants cellulaires par la méthode de Bradford.

▶ Reprise des échantillons (quantité représentant une DO_{600nm}=1) dans une solution de charge (4% SDS, 100Mm Tris-HCl 12% glycérol, 2% β-mercaptoéthanol, 0.01% bleu de Coomassie G250).

▶ **Dénaturation** à 95°C durant 5 min.

▶ **Séparation des protéines** sur un gel dénaturant de polyacrylamide à 8%.

▶ **Transfert** sur une membrane de nitrocellulose (Schleicher et Schuell, Dassel, Allemagne) pendant 1 heure sous ampérage constant (0.8 mA/cm²).

▶ **L'immunodétection** de PARP se fait à l'aide d'un anticorps de lapin anti-PARP (Roche Molecular Biochemicals) utilisé au 1 : 3000^{ème} et d'un kit de détection (Roche Biomolecular Biochemicals, Ottweiler, Allemagne) selon les recommandations du fabricant.

Les contrôles sont constitués de cellules non transfectées et de cellules incubées 2 heures avec 1 µM de staurosporine.

4.2.a.ii. Résultat.

Le *western-blot* révèle la présence de fragment de PARP clivé après induction de l'apoptose dans les extraits cellulaires provenant de cellules traitées à la staurosporine (figure 37 piste 1). A l'inverse, nous constatons l'absence de coupure de PARP dans les extraits cellulaires provenant de cellules humaines non transfectées (figure 37 piste 2), tout comme dans ceux de cellules exprimant pORF2-EGFP (figure 37 piste 3). Sur la base de ce résultat, nous ne pouvons pas conclure à une activation de la caspase-3 et/ou de la caspase-7 dans les stades précoces de la MCP induite par *galig*.

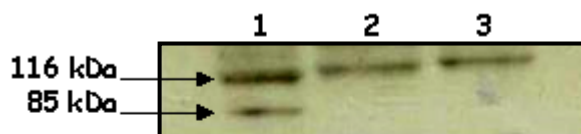


Figure 37 : Détection de PARP dans des extraits cellulaires de HeLa.

Cellules HeLa : 1) traitées à la staurosporine, 2) non transfectées, 3) transfectées avec le vecteur d'expression eucaryotes pORF2-EGFP codant la mitogaligine-EGFP + cytogaligine. Les extraits cellulaires sont analysés sur un gel SDS-PAGE à 8% polyacrylamide, transférés sur une membrane de nitrocellulose, et incubés avec de l'anti-PARP au 1 :3000^{ème}.

4.2.b. Test PhiPhilux®.

Ce test permet d'étudier l'activation de la caspase-3. Les cellules sont incubées avec une solution de substrat de la caspase-3 perméable aux cellules. Le substrat contient un fluorophore de part et d'autre du site de clivage spécifique de la caspase-3 (GDEVDGI). La proximité spatiale des deux molécules fluorophores éteint leur fluorescence. Le clivage du peptide par la caspase-3 s'accompagne d'une augmentation de l'intensité de fluorescence (λ_{max} d'excitation= 552 nm, λ d'émission= 580 nm) (Packard *et al.*, 1996).

4.2.b.i. Matériel et méthodes.

❖ Culture cellulaire et transfection transitoire.

Les cellules HeLa sont mises en culture et transfectées (chapitre 1, II.1.1.a) par les plasmides :

- pEGFP N3 (exprime EGFP seul)
- pORF2-EGFP (exprime la mitogaligine-EGFP et la cytogaligine)

Les contrôles sont constitués de cellules non transfectées ou incubées 1 heure avec 1 mM de H₂O₂.

❖ **Révélation de l'activité de la caspase-3.**

Les cellules sont incubées avec un substrat de la caspase-3 : le PhiPhilux® conformément aux recommandations du fabricant (OncoImmunitin, Inc. Gaithersburg, MD), 17 à 36 heures après la transfection. Brièvement, 50 µl de la solution de substrat sont distribués, une lamelle permet d'obtenir une répartition homogène de la solution dans les puits. L'incubation se fait à 37°C, durant 30 minutes à l'abri de la lumière.

4.2.b.ii. Résultat.

Les cellules traitées à l'eau oxygénée entrent en apoptose et apparaissent positives pour l'activation de la caspase-3 (coloration rouge) figure 38.

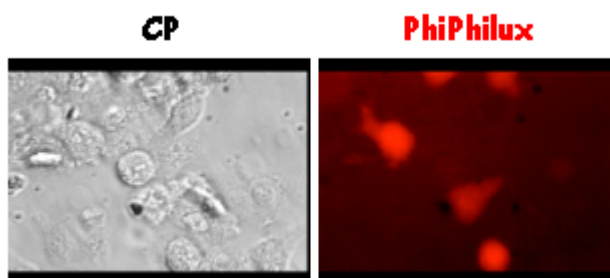


Figure 38 : Activation de la caspase-3 dans les cellules traitées à l'eau oxygénée.

Cellules HeLa traitées à l'eau oxygénée (1mM H₂O₂, 1 heure) et analysées par microscopie en contraste de phase (CP) et par microscopie de fluorescence pour l'activation de la caspase-3 par le test au PhiPhilux® (PhiPhilux). Les cellules apoptotiques apparaissent avec une fluorescence rouge. Grossissement : X 320.

Les cellules témoins transfectées par pEGFP N3 rendent bien compte du résultat attendu, elles sont positives en vert (production de EGFP) et négatives en rouge (absence d'activation des caspase-3) (figure 39 **A**). La transfection transitoire et la surexpression de EGFP ne sont donc pas responsables de l'activation de la caspase-3. Les clichés **B**, **C**, **D** de la figure 39 ne permettent pas non plus d'observer des cellules doublement marquées en vert et en rouge. Les quelques rares cellules positives pour l'activation de la caspase-3 reflètent une apoptose spontanée dans la mesure où ces cellules marquées en rouges ne sont jamais marquées en vert (figure 39 **B** et **C**). Cette expérience montre que les cellules exprimant *galig* ne présentent pas d'activation de la caspase-3.

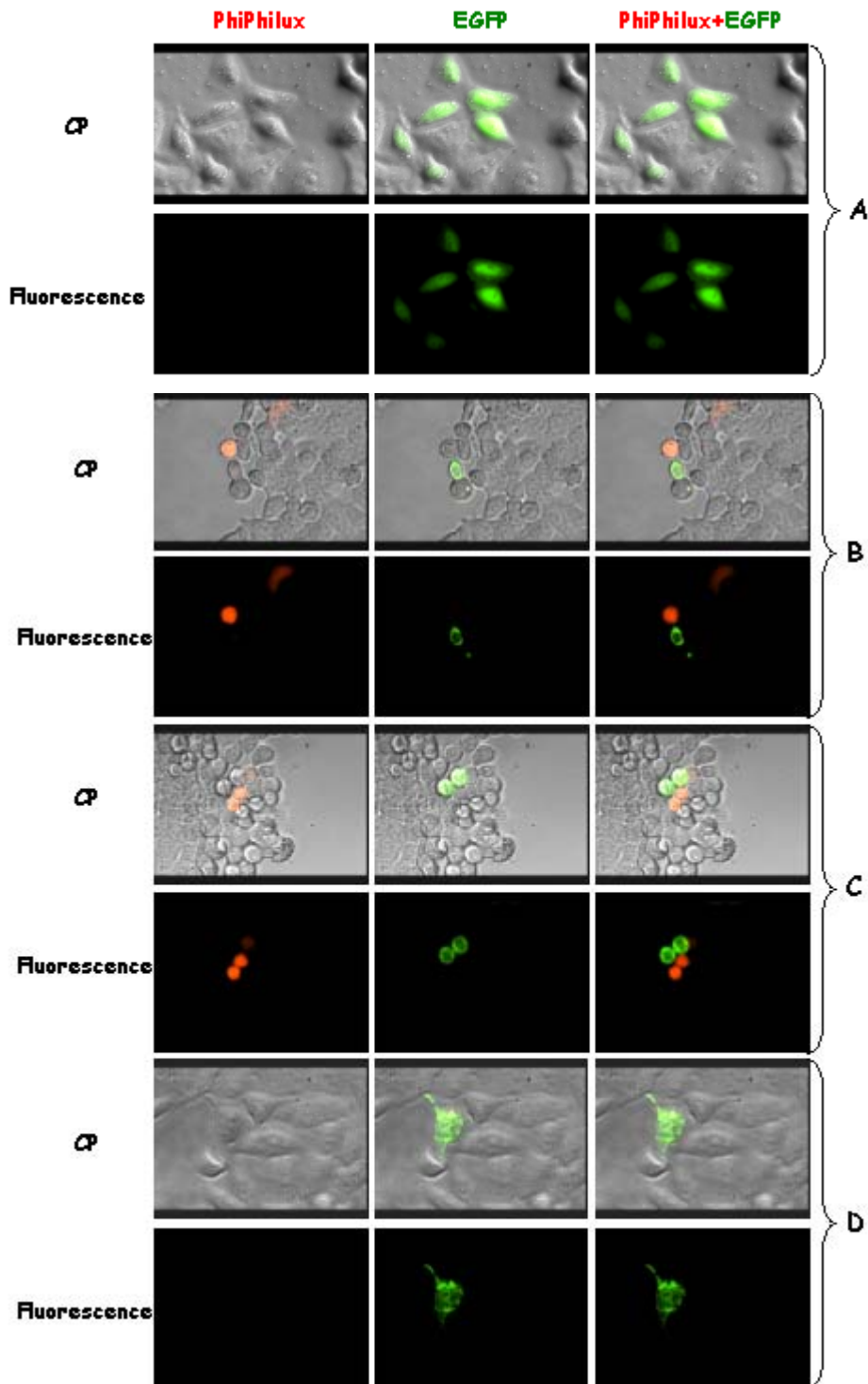


Figure 39 : Absence d'activation de la caspase-3 dans les cellules exprimant les protéines codées par *galig*.

Cellules HeLa transfectées avec(A) Pegfp N3, (lignes B, C, D) pORF2-EGFP. 36 heures après transfection, les cellules sont analysées par microscopie de fluorescence pour l'expression des galigines (colonne EGFP), et pour l'activation de la caspase-3 par le test au PhiPhilux® (colonne PhiPhilux). Les photographies superposées (colonne PhiPhilux+EGFP) montrent que les cellules positives pour EGFP sont négatives pour PhiPhilux. Les lignes CP correspondent à une superposition des photographies prises en contraste de phase et en fluorescence. Grossissement : X 320.

4.2.c. Conclusion.

Ces expériences ne nous permettent pas de mettre en évidence une activation de la caspase-3 dans les cellules qui expriment *galig*. Une autre observation vient renforcer ces conclusions. Les cellules MCF-7 (lignée humaine de carcinome mammaire) ne comportent pas de caspase-3 fonctionnelle puisqu'elles présentent une délétion de 47 pb dans l'exon 3 du gène de la caspase-3 (Janicke *et al.*, 1998). Malgré cette particularité, nous avons pu constater que ces cellules MCF-7 transfectées par *galig* subissent des modifications de leur morphologie et meurent, ce qui conforte l'hypothèse d'un mécanisme indépendant de la caspase-3. Ainsi nous serions à même de conclure que la voie moléculaire induite par *galig* ne nécessite pas l'activité de la caspase-3.

5. *Galig* et les protéines Bcl-2 et Bcl-X_L.

Les protéines de la famille Bcl-2 sont des protéines qui intègrent et transmettent des signaux de mort aux exécuteurs. Elles exercent un contrôle critique dans l'exécution de certains programmes de mort cellulaire. Nous avons voulu déterminer si des protéines de cette famille pouvaient intervenir dans la régulation des voies de signalisation de la mort cellulaire dépendante de *galig*.

La figure 12 (article chapitre 1) rend compte de l'effet de la co-expression des galigines et de la protéine anti-apoptotique Bcl-X_L sur la libération cytosolique du cytochrome c en transfection transitoire. Ces expériences suggèrent un effet protecteur de Bcl-X_L lors de l'expression de *galig*. En effet, la quantité estimée de cytochrome c détectée dans ce surnageant cellulaire est significativement inférieure à celle détectée dans le surnageant cellulaire obtenu lors de la seule expression de *galig*.

Par contre, ce même effet protecteur n'a pas pu être établi pour la protéine anti-apoptotique Bcl-2.

Cette expérience a été complétée par des observations en microscopie de fluorescence.

5.1. Matériel et méthodes.

Culture cellulaire, transfection transitoire.

Les cellules HeLa sont mises en culture dans des boîtes 12 puits à raison de $8 \cdot 10^4$ cellules par puits, les cellules sont co-transfectées, avec 1 μ g de chacun des ADN (chapitre 1, II.1.1.a), par les vecteurs pORF2-DsRED2 codant la mitogaligine-DsRED2 + la cytogaligine et :

- pEGFP N3 codant EGFP.
- pGFP-Bcl-X_L codant la protéine Bcl-X_L fusionnée à EGFP.
- pGFP-Bcl-2 codant la protéine Bcl-2 fusionnée à EGFP.

Les cellules sont observées 40 heures après transfection en microscopie de fluorescence.

5.2. Résultat.

Les cellules transfectées produisant la mitogaligine-DsRED2 et EGFP présentent la localisation attendue des protéines de fusion : la mitogaligine-DsRED2 (figure 40 A, colonne DsRED2) est localisée dans les mitochondries et la protéine EGFP (figure 40 A colonne EGFP) est localisée dans le cytosol et le noyau. De même, comme décrit dans l'article (chapitre 1) la majeure partie des cellules fluorescentes rouges exprimant la mitogaligine présente une morphologie typique des cellules mortes : elles sont petites, rondes, avec un cytoplasme condensé et des mitochondries agrégées.

La co-transfection par les vecteurs pORF2-DsRED2 et pGFP Bcl-X_L permet d'observer une nette diminution du nombre de cellules fluorescentes rouges présentant une morphologie anormale. Les cellules apparaissent plus étalées avec des mitochondries moins agrégées (figure 40, lignes **B**). Nous constatons donc une modification de la morphologie des cellules exprimant le gène *galig*. La fluorescence rouge de la mitogaligine-DsRED2 est associée aux mitochondries ce qui nous permet de vérifier que l'expression de Bcl-X_L-EGFP n'entrave pas l'adressage de la mitogaligine à la mitochondrie (figure 40, **B** colonne DsRED2). Ce point est important car il rend compte du fait que la diminution du cytochrome *c* cytosolique libéré de la mitochondrie n'est pas reliée à l'absence de la localisation intracellulaire de la mitogaligine. Ce résultat suggère que l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-X_L s'oppose à l'effet toxique de *galig*.

Les cellules co-exprimant *galig* et Bcl-2-EGFP ne permettent pas d'observer un tel effet protecteur. Les cellules apparaissent rondes, elles présentent une morphologie comparable aux cellules transfectées par *galig*. Ceci est en accord avec le fait que la libération extra-mitochondriale du cytochrome *c* n'est pas affectée par l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (figure 12 article, chapitre 1).

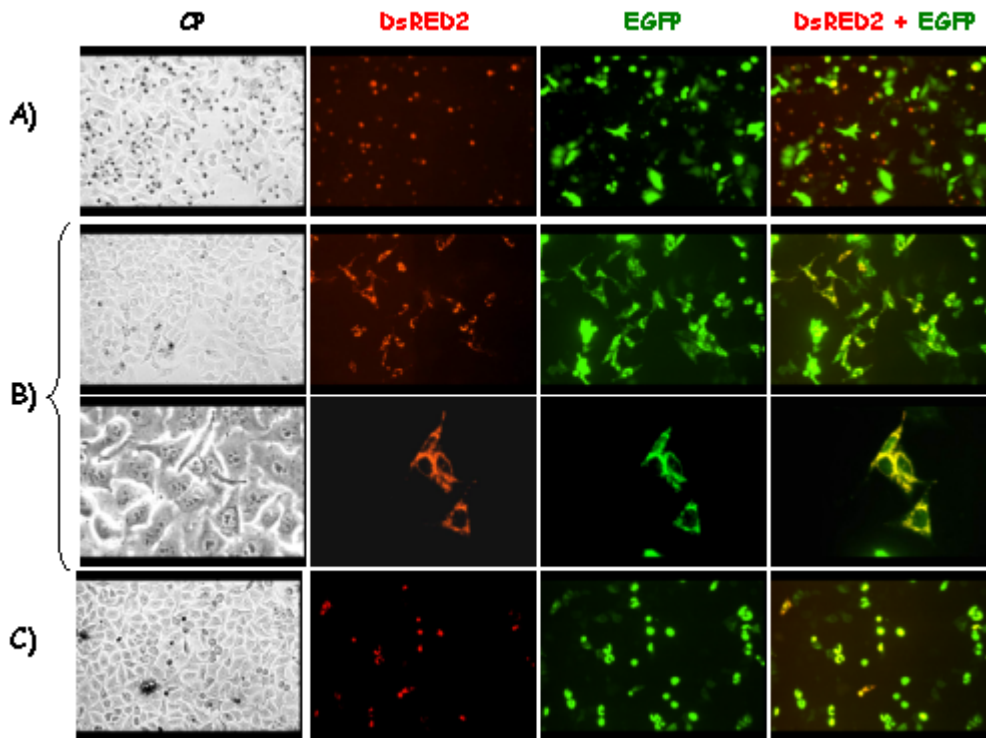


Figure 40 : Morphologie de cellules exprimant *galig* avec les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 ou Bcl-X_L.

Cellules HeLa co-transfectées avec les vecteurs codant **A)** la mitogaligine-DsRED2 + la cytogaligine et EGFP, **B)** la mitogaligine-DsRED2 + la cytogaligine et Bcl-X_L-EGFP **C)** la mitogaligine-DsRed2 + la cytogaligine et GFP-Bcl-2. Les cellules sont analysées par microscopie de fluorescence 40h après transfection, pour l'expression des galigines (colonne **DsRED2**), et pour l'expression des protéines Bcl-X_L et Bcl-2 (colonne **EGFP**). La colonne de droite représente la superposition des deux photographies **DsRED2 + EGFP**. Grossissement : X 100, la 2^{ème} ligne de B) X 320.

5.3. Conclusion.

L'activité cytotoxique induite par l'expression de *galig* est significativement réduite lors de l'expression simultanée de la protéine anti-apoptotique Bcl-X_L. Les résultats obtenus nous permettent de supposer que l'effet protecteur de Bcl-X_L passerait par la "protection" des mitochondries. Cet effet protecteur pourrait se traduire par la conservation de l'intégrité des membranes mitochondriales puisque l'on peut constater une diminution de la libération de cytochrome c. Par ailleurs, les mitochondries présentent une morphologie moins condensée.

6. Conclusions.

Les principaux résultats obtenus lors de l'étude des protéines codées par le gène *galig* ont été repris dans le tableau ci-dessous. Les cellules exprimant *galig* partagent quelques caractéristiques avec les cellules qui subissent l'apoptose : une libération cytosolique de cytochrome *c*, une absence de rupture de la membrane plasmique. Cependant, des différences avec l'apoptose ont également été constatées : le clivage inter-nucléosomique de l'ADN ou l'activation de la caspase-3 n'ont pas été mis en évidence.

Ainsi, l'hypothèse que la mort médiée par *galig* représente une forme alternative de mort cellulaire programmée peut être émise.

Tableau 4 : Récapitulatif des altérations cellulaires consécutives à l'expression de *galig* dans des cellules humaines en culture.

Noyau	Membrane cellulaire	Cytoplasme	Caractéristiques biochimiques
Condensation partielle des acides nucléiques	Pas de rupture de la membrane	Diminution du volume cellulaire.	Libération cytosolique de cytochrome <i>c</i> .
Pas de coupure inter-nucléosomique, pas d'effet TUNEL	Pas de bourgeonnements Redistribution de la phosphatidylsérine	Augmentation de la granularité.	Activation de la caspase-3 non détectée.
Pas d'échelle d'ADN détecté (non montré)		Condensation et agrégation des mitochondries.	Effet protecteur de Bcl-X _L .

III. *Galig* et *galectine-3*.

Les gènes chevauchants sont classés selon trois catégories structurales. La paire de gène que forme *galig* et la *galectine-3* présente une configuration dite en arrangement parallèle, *galig* étant totalement emboîté dans le gène de la *galectine-3* (figure 41). Deux autres cas de gènes eucaryotes supérieurs présentant ce même type d'arrangement ont été décrits (Labarriere *et al.*, 1995; Quelle *et al.*, 1997; Quelle *et al.*, 1995).

Figure 41 : Représentation schématique de l'arrangement parallèle de gènes chevauchants.



Les gènes de la *galectine-3* et *galig* pris en exemple sont codés par le même brin d'ADN.

La *galectine-3* est décrite comme une protéine multifonctionnelle. Il a été démontré que la *galectine-3* possède une activité anti-apoptotique et qu'elle est transloquée à la membrane mitochondriale sous l'action de stimuli apoptotiques. Cette localisation lui permet de protéger la mitochondrie et inhibe la libération cytosolique de cytochrome *c* (Yu *et al.*, 2002). La *galectine-3* contient le motif protéique NWGR très conservé parmi les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et interagit avec la protéine Bcl-2 *via* un processus dépendant du lactose (Akahani *et al.*, 1997). Le locus *LGALS3* contient donc deux gènes présentant des fonctions opposées. De plus, l'expression de *galig* semble indépendante de celle de la *galectine-3* puisqu'il existe des tissus dans lesquels seul l'un ou l'autre des transcrits est exprimé (Guittaut *et al.*, 2001).

Nous avons voulu déterminer si la *galectine-3* pouvait intervenir dans le mécanisme d'action de *galig*. De la même façon que pour les protéines de la famille Bcl-2, nous avons cherché à déterminer si la *galectine-3* pouvait interférer avec la libération cytosolique du cytochrome *c* induite par *galig* et ainsi contrebalancer son action cytotoxique.

1. Matériel et méthodes.

1.1. Culture cellulaire, transfection transitoire.

Les cellules HeLa sont mises en culture dans des boîtes 6 puits et co-transfectées avec une quantité de 5µg d'ADN/puits (2,5 µg de chacun des ADN), (chapitre 1, II.1.1.a) par le plasmide pORF2-EGFP codant la mitogaligine-EGFP + la cytogaligine et pHG3 codant la protéine *galectine-3* ou pEGFP N3 (codant EGFP)

Une expérience contrôle consiste à transfecter pHG3 et pEGFP N3.

1.2. Détection du cytochrome *c* cytosolique.

La mise en évidence *in vitro* de la forme dénaturée du cytochrome *c* est réalisée dans les lysats de cellules HeLa transfectées (article chapitre 1, I). L'immunodétection du cytochrome *c* se fait par chimioluminescence, à l'aide d'un anticorps de souris anti-cytochrome *c* (BD Biosciences PharMingen clone 7H8.2C12) utilisé au 1 : 2000^{ème}.

2. Résultat.

La piste **1** (figure 42), correspond au cytochrome *c* détecté dans le surnageant des cellules transfectées par le vecteur codant EGFP seul.

De manière surprenante, dans la piste **2**, nous observons une bande qui révèle la détection de cytochrome *c* cytosolique consécutive à l'expression de la galectine-3. Ce résultat a pu être observé sur des expériences indépendantes.

La piste **3** correspond aux cellules co-exprimant les ADNc galectine-3 et *galig*. L'intensité de la bande cytochrome *c* est semblable à celle de la piste **4** laquelle correspond aux cellules transfectées par *galig* seul. Ainsi la galectine-3 ne parait pas influencer sur la libération du cytochrome *c* induite lors de l'expression de *galig*.

Ce résultat ne nous permet pas de conclure définitivement que la galectine-3 n'intervient pas dans la mort cellulaire induite par *galig*. Cependant, la galectine-3 ne semble pas apporter d'effet protecteur sur la membrane mitochondriale lors de l'expression de *galig*.

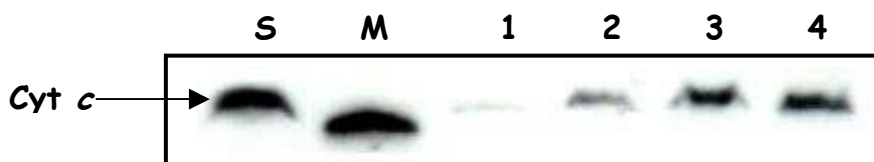


Figure 42 : Libération extra-mitochondriale de cytochrome *c* consécutive à l'expression des gènes codant : EGFP, EGFP et galectine-3, galectine-3 et *galig*, EGFP et *galig*.

Cellules HeLa transfectées avec des vecteurs d'expression eucaryotes codant 1) EGFP, ou co-transfectées avec 2) EGFP et la galectine-3, 3) la galectine-3 et p ORF2-EGFP, 4) EGFP et pORF2-EGFP. **S** culot cellulaire traité à la saponine, **M** cytochrome *c* de cheval. Les extraits cellulaires sont analysés sur un gel SDS-PAGE à 12% polyacrylamide, transférés sur membrane de nitrocellulose, et incubés avec de l'anti-cytochrome *c* au 1 :2000^{ème}.

3. Conclusion.

Ce résultat est concordant avec des expériences de microscopie. En microscopie de fluorescence, la morphologie des cellules co-transfectées avec *galig* et *galectine-3* est comparable à celle de cellules transfectées par *galig* seul et montre des cellules mortes.

CHAPITRE 2: Etude des relations structure /fonction de la mitogaligine.

I. Caractérisation du signal d'adressage mitochondrial de la mitogaligine.

Etant donné que la mitogaligine présente une localisation mitochondriale (Guittaut *et al.*, 2001), nous avons voulu caractériser et identifier la séquence signal permettant le transport spécifique de cette protéine vers ces organelles. Des vecteurs codant différents fragments de la mitogaligine fusionnés au gène reporteur de EGFP ont permis de tester expérimentalement la région de la protéine impliquée dans sa localisation cellulaire. Il s'est avéré que seules les cellules transfectées avec les plasmides comportant la partie centrale de la protéine, (fragments [1_54] et [31_54]) permettait l'observation d'une fluorescence associée aux mitochondries (article chapitre 1, figure 8). Les parties N et C-terminales ne sont pas impliquées dans l'adressage de la mitogaligine vers les mitochondries et ne contiennent donc pas de séquence de localisation.

Ce premier résultat illustre l'originalité de la mitogaligine puisque les signaux d'adressages mitochondriaux sont le plus généralement situés dans la partie N-terminale des protéines (Pfanner *et al.*, 1997). Cependant, la mitogaligine ne constitue pas une exception, d'autres protéines sont connues pour détenir des séquences internes assurant leur localisation intracellulaire. Ces signaux comportent de nombreux acides aminés hydrophobes, hydroxylés (Ser, Thr) et de nombreuses charges positives (Arg et Lys). Dans le but d'affiner l'étude des relations structure/localisation, nous avons voulu déterminer la séquence minimale capable de cibler la mitogaligine à la mitochondrie. Pour ce faire, nous avons construit, à partir du plasmide p MG-31_54 EGFP, différents vecteurs produisant des formes délétées en N-terminal et C-terminal du peptide de localisation mitochondrial.

1. Matériel et méthodes.

1.1. Construction des vecteurs.

Les délétions sont produites en une seule étape en réalisant une PCR inverse (Ochman *et al.*, 1988) à partir de la matrice pMG-31_54 EGFP (figure 43).

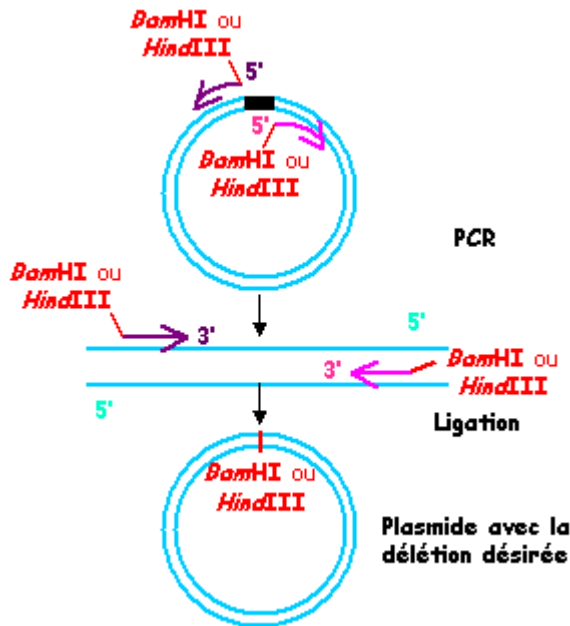


Figure 43 : Schéma de PCR inverse.

La PCR inverse permet d'amplifier dans sa totalité un plasmide. Une délétion peut être introduite par rapport à l'extrémité 5' des amorces (rectangle noir). La ligation est réalisée au niveau d'un site *Bam*HI ou *Hind*III introduits dans les amorces.

Le milieu réactionnel (50 µl) contient :

- 10 ng d'ADN matrice, (plasmide p MG-31_54 EGFP)
- 1 µM de chacune des amorces
- 0,2 mM de d NTP (désoxyribonucléotides sous forme triphosphate)
- une unité de *Pfu* ADN polymérase (Promega)
- 5 µl de tampon 10X (Tris HCl pH 8,8 100 mM, KCl 500 mM, Nonidet P40 0.8%)

Les amorces utilisées (MWG Biotech AG, Ebersberg, Allemagne) sont présentées dans le tableau 5. La réaction PCR est réalisée dans un appareil à cycles thermiques programmables (iCycler Thermal Cycler, Biorad, USA) et se déroule comme suit :

Trois minutes de dénaturation préalable à 94°C suivies de 30 cycles d'amplification composés de :

- 1 minute de dénaturation à 95°C (séparation es deux brins d'ADN)
- 1 minute d'hybridation avec les amorces, la température est variable suivant la nature et la séquence des couples d'amorces.
- 10 minutes d'extension des amorces à 72°C.

Puis 10 minutes d'extension finale des fragments à 72°C.

Dépôt des produits PCR sur un gel d'agarose à 0.6%.



Découpage dans le gel des bandes correspondantes aux fragments PCR amplifiés.



Elution de l'ADN avec le kit d'élution « QIAquick Gel Extraction Kit-QIAGEN »
(selon les recommandations du fabricant).



RESULTATS. Chapitre 2. Relations structure/fonction de la mitogaligine.

Digestion de l'éluat (fragments PCR) par l'enzyme de restriction *Bam*HI ou *Hind*III à 37°C

toute la nuit.



Inactivation de l'enzyme par la chaleur pendant 15 min à 65°C.



Re-circularisation du fragment de PCR. Ligation (2 heures à 22°C) en présence de 2 unités de T4 ADN ligase (Fermentas Inc, Hanovre, MD) dans un volume total de 20 µl.

Tableau 5 : Couples d'amorces utilisés pour la construction des vecteurs d'expression eucaryotes porteurs des différentes délétions de la protéine traduite par l'ORF2 (mitogaligine, MG) fusionnées à EGFP.

Pour la détermination de l'extrémité N-terminale, (pMG-31,32,33,34_54 EGFP) les amorces contiennent, en plus du site de restriction pour l'enzyme *Hind*III (nucléotides soulignés), la séquence ACC permettant d'obtenir un contexte d'initiation de traduction plus fort (séquence Kozak). Pour la détermination de l'extrémité C-terminale, (pMG-31_50,49,48,47,46 EGFP), les nucléotides soulignés correspondent au site de restriction de l'enzyme *Bam*HI.

Nom plasmides	Amorces	Séquences des amorces
pMG-31_54 EGFP	MG3154Ko MGISR	TGTC <u>AAGCTT</u> ACC ATG AGG GGC TTA TCC TGG ACA CTCCA <u>AAGCTT</u> GAG TCC GGTAGC GCT AGC GG
pMG-32_54 EGFP	MG3254Ko MGISR	TGTC <u>AAGCTT</u> ACC ATG GGC TTA TCC TGG ACA GGC CTCCA <u>AAGCTT</u> GAG TCC GGTAGC GCT AGC GG
pMG-33_54 EGFP	MG3354Ko MGISR	TGTC <u>AAGCTT</u> ACC ATG TTA TCC TGG ACA GGC ACC CTCCA <u>AAGCTT</u> GAG TCC GGTAGC GCT AGC GG
pMG-34_54 EGFP	MG3454Ko MGISR	TGTC <u>AAGCTT</u> ACC ATG TCC TGG ACA GGC ACC TCC CTCCA <u>AAGCTT</u> GAG TCC GGTAGC GCT AGC GG
pMG-31_50 EGFP	MG50-45R GFP-Bam	AAGT <u>GGATCC</u> GGA TAA GCT CCA GGT GCT GTG <u>GGATCC</u> GTG AGC AAG GGC GAG GAG
pMG-31_49 EGFP	MG49-44R GFP-Bam	AAGT <u>GGATCC</u> TAA GCT CCA GGT GCT CCA GTG <u>GGATCC</u> GTG AGC AAG GGC GAG GAG
pMG-31_48 EGFP	MG48-43R GFP-Bam	AAGT <u>GGATCC</u> GCT CCA GGT GCT CCA GGG TA GTG <u>GGATCC</u> GTG AGC AAG GGC GAG GAG
pMG-31_47 EGFP	MG47-42R GFP-Bam	AAGT <u>GGATCC</u> CCA GGT GCT CCA GGG TAG GTG <u>GGATCC</u> GTG AGC AAG GGC GAG GAG
pMG-31_46 EGFP	MG46-41R GFP-Bam	AAGT <u>GGATCC</u> GGT GCT CCA TGG TAG GCG GTG <u>GGATCC</u> GTG AGC AAG GGC GAG GAG

1.2. Vérification et amplification des vecteurs.

▸ Transformation bactérienne :

Cinquante µl de bactéries *E.coli DH5α* (compétentes) sont incubés avec 5 µl de solution de produits de la ligation pendant 30 minutes à 4°C. On procède ensuite à un choc thermique : les bactéries sont plongées dans un bain à 37°C pendant 30 secondes puis maintenues 2 minutes dans la glace.

▸ Expression du gène de résistance à la kanamycine:

Les bactéries sont incubées 1h à 37°C en présence de 550 µl de milieu SOC (Biomérieux, France ; peptone tryptique de caséine 2%, extraits de levure 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucose 20 mM) et placées sous agitation modérée.

▸ Etalement des bactéries :

Deux cents µl de la suspension bactérienne sont étalés sur une boîte de milieu LB solide (Luria-Bertani ; Biomérieux, France ; peptone tryptique de caséine 1%, extraits de levure 0.5%, NaCl 10 mM, Agar 15 g/l, pH 7) contenant 50 µg/ml de kanamycine (Sigma Aldrich, France) et placée à 37°C jusqu'à apparition des clones.

▸ Extraction des plasmides par "minipreps".

Les colonies bactériennes obtenues après transformation sont testées par la technique des "minipreps" classiques (Birnboim et Doly, 1979). Les plasmides extraits des bactéries sont analysés sur des gels d'agarose en présence de bromure d'éthidium (BET).

▸ Séquençage.

Toutes les constructions ayant la taille attendue sont vérifiées par un séquençage effectué par la société MWG Biotech AG.

▸ Amplification des plasmides pour transfection.

Après vérification par séquençage, les vecteurs sont amplifiés et extraits à l'aide du kit Qiagen Endofree Plasmid Maxi kit (Allemagne) selon les recommandations du fabricant.

Nous obtenons plusieurs vecteurs comportant le promoteur du CMV suivi des ADNc correspondant aux formes tronquées de la séquence de ciblage de la mitogaligine fusionnées avec le gène reporteur de EGFP.

1.3. Culture cellulaire, transfection transitoire, microscopie de fluorescence.

Les cellules HeLa sont transfectées [chapitre1, II.1.1.a] par les vecteurs portants des délétions de la séquence de localisation mitochondriale. La distribution des protéines de fusion est analysée 48 heures après la transfection en microscopie de fluorescence.

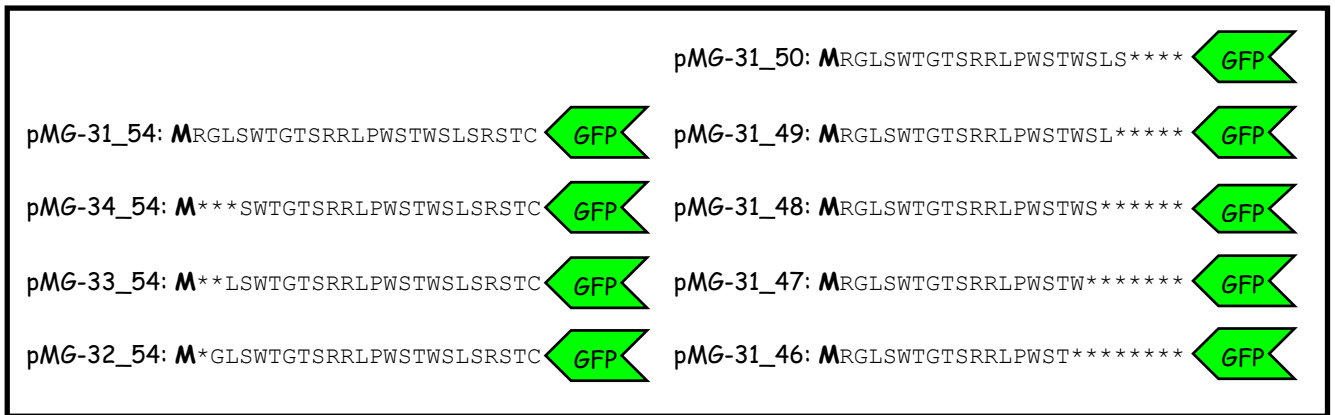


Figure 44 : Représentation schématique des vecteurs utilisés pour identifier la séquence d'adressage de la mitogaligine.

A partir du plasmide pMG-31_54, des délétions ont été réalisées par PCR inverse. Les noms des plasmides correspondent aux aa de la mitogaligine qui ont été conservés. Les étoiles (*) permettent de positionner les aa qui ont été délétés dans chaque vecteur. Dans la mesure où la séquence d'adressage est en position centrale, un résidu méthionine a été ajouté en première position.

2. Résultat.

La transfection par pEGFP N3 montre, comme attendu, une localisation cytosolique et nucléaire de la protéine EGFP (figure 45 **A**). Le vecteur produisant la mitogaligine-EGFP et celui produisant une protéine de fusion comportant les aa 31 à 54 de la mitogaligine présentent une localisation mitochondriale (**B**, **C**).

2.1. Extrémité N-terminale.

Le vecteur codant le fragment 34 à 54 de la mitogaligine fusionné avec EGFP produit une protéine de fusion délocalisée vers les compartiments nucléaires et cytosoliques (figure 45 **D**). Ce résultat permet de conclure que l'extrémité N-terminale du signal de localisation mitochondriale se situe en position 31, 32 ou 33.

La fluorescence associée à la production des protéines correspondant aux séquences 32 à 54 et 33 à 54 témoigne d'une localisation cytosolique sans aucune association avec les mitochondries (figure 45 **E**, **F**).

Etant donné que le vecteur pMG-31_54 EGFP permet la production d'une protéine mitochondriale (figure 45 **C**), on peut conclure que l'arginine 31 est le premier aa du signal d'adressage de la mitogaligine.

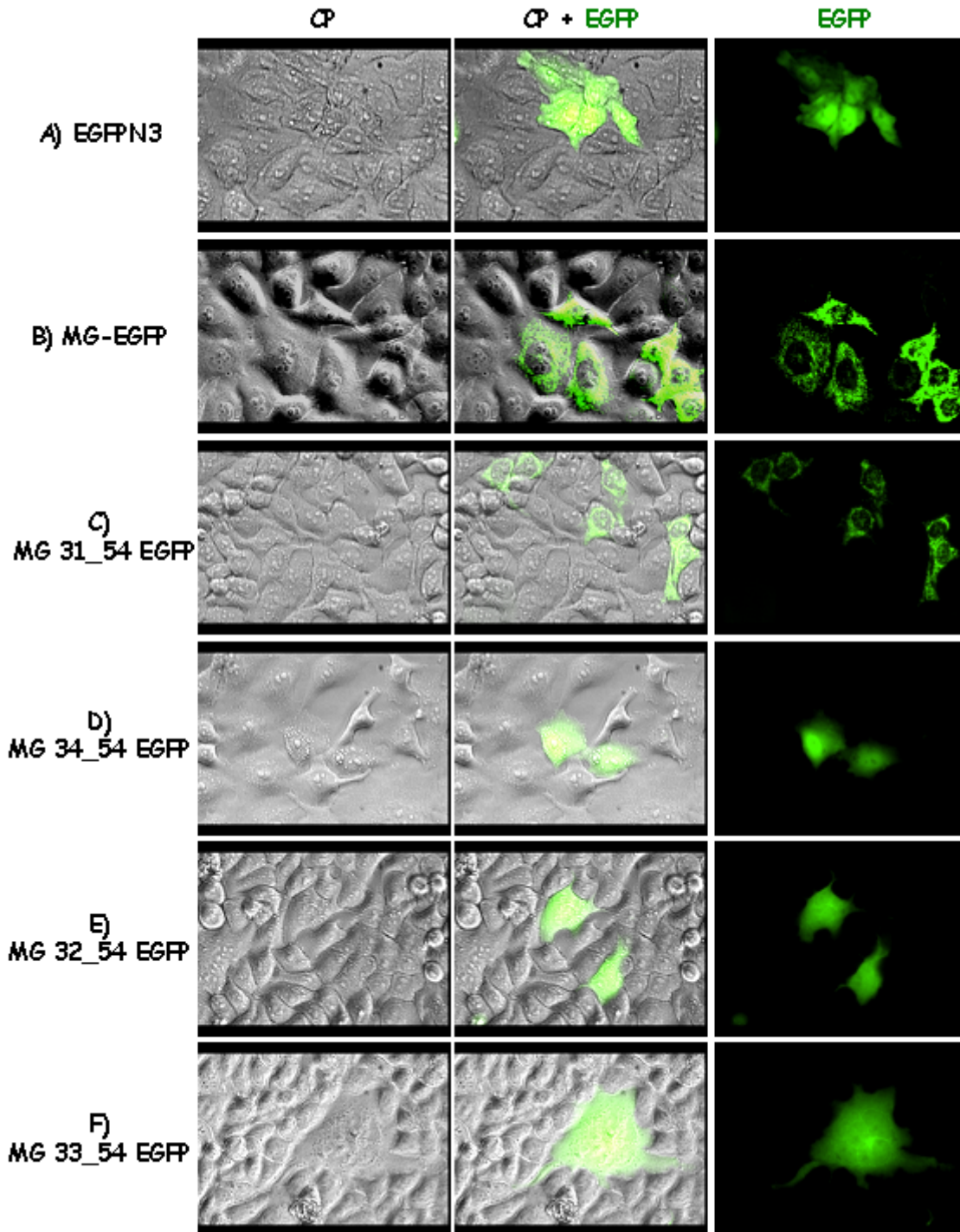


Figure 45: Localisation intracellulaire des délétions en N-terminale de la séquence signal de la mitogaligine.

Cellules HeLa observées en microscopie de fluorescence 48 heures après transfection de vecteurs codant A) EGFP ou des fusions de EGFP avec B) la mitogaligine, C) les aa 31 à 54 de la mitogaligine, D) les aa 34 à 54 de la mitogaligine, E) les aa 32 à 54 de la mitogaligine, F) les aa 33 à 54 de la mitogaligine. Les cellules sont observées en contraste de phase (CP), pour l'expression de EGFP (EGFP). La colonne du milieu représente la superposition des deux photographies des colonnes CP + EGFP. Grossissement : X 320.

2.2. Extrémité C-terminale.

Les protéines de fusion EGFP produites par les vecteurs pMG-31_47 à pMG-31_54 EGFP (figure 46 **A** à **E**) présentent une localisation mitochondriale, les aa 47 à 54 (WSLSRSTC) ne sont par conséquent, pas indispensables pour l'adressage de la mitogaligine. Par contre, le vecteur pMG-31_46 EGFP produit une protéine de fusion localisée dans le cytosol (figure 46 **F**). L'extrémité C-terminale est par conséquent délimitée par le Tryptophane (47).

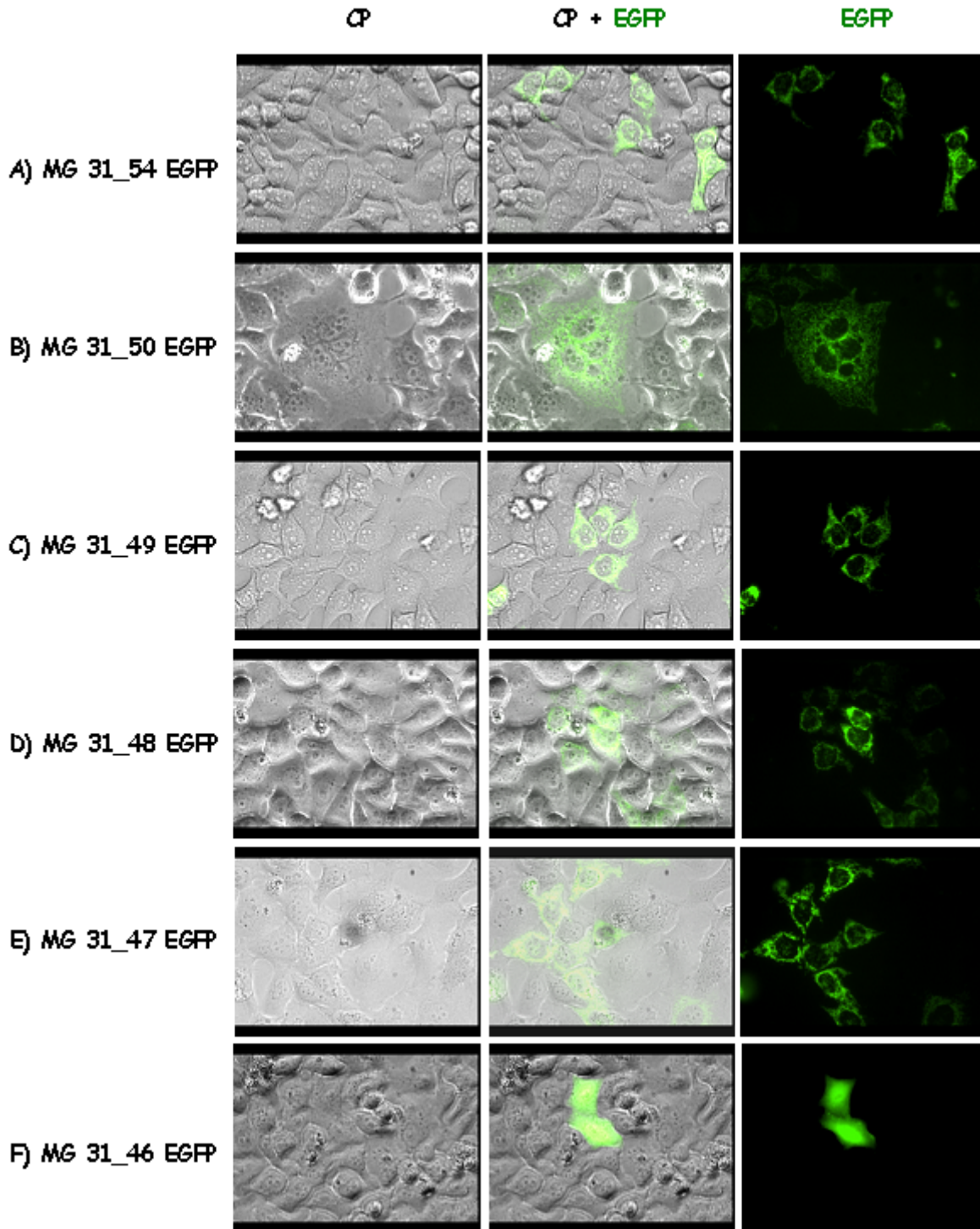


Figure 46 : Localisation intracellulaire des délétions en C-terminale de la séquence signal de la mitogaligine.

Cellules HeLa observées en microscopie de fluorescence 48 heures après transfection de vecteurs d'expression, codant des fusions de EGFP avec **A)** les aa 31 à 54 de la mitogaligine, **B)** les aa 31 à 50 de la mitogaligine, **C)** les aa 31 à 49 de la mitogaligine, **D)** les aa 31 à 48 de la mitogaligine, **E)** les aa 31 à 47 de la mitogaligine, **F)** les aa 31 à 46 de la mitogaligine. Les cellules sont observées en contraste de phase (CP), pour l'expression de EGFP (EGFP). La colonne du milieu représente la superposition des deux photographies des colonnes CP + EGFP. Grossissement : X 320

3. Conclusion.

La séquence interne **R₃₁GLSWTGTSRRLPWSTW₄₇** constitue la séquence signal nécessaire et suffisante pour adresser la mitogaligine à la mitochondrie.

II. Localisation mitochondriale et fuite de cytochrome

c.

1. Libération de cytochrome c associée aux formes délétées en N et C -terminales de la mitogaligine.

Dans le but de déterminer s'il existe une relation entre l'adressage de la mitogaligine à la mitochondrie et la redistribution du cytochrome c dans le cytoplasme, nous avons testé par *western-blot* si nous pouvions détecter du cytochrome c dans le surnageant de lysat cellulaire après transfection transitoire de vecteurs codant différentes formes tronquées de la mitogaligine.

1.1. Matériel et méthodes.

1.1.a.i. Culture cellulaire, Transfection transitoire.

Les cellules HeLa sont transfectées (chapitre 1, II.1.1.a) par les vecteurs d'expression eucaryote : pEGFP N3, pMG-31_54 EGFP, pgalig, pMG-31_47 EGFP, pMG-31_48 EGFP, pMG-31_49 EGFP, pMG-32_54 EGFP, pMG-31_46 EGFP.

1.1.a.ii. Détection du cytochrome c.

La mise en évidence *in vitro* de la forme dénaturée du cytochrome c est réalisée dans les lysats de cellules HeLa transfectées (article chapitre 1, I). L'immunodétection du cytochrome c se fait par chimioluminescence, à l'aide d'un anticorps de souris anti-cytochrome c (BD Biosciences PharMingen clone 7H8.2C12) utilisé au 1 : 2000^{ème}.

1.2. Résultat.

La piste **8** (figure 47), est un contrôle correspondant au cytochrome c détecté dans le surnageant des cellules transfectées par le vecteur pEGFP N3. La transfection en elle-même, et l'expression de la protéine EGFP n'altère pas l'état des mitochondries puisque nous ne détectons pas une quantité importante de cytochrome c cytosolique.

Les pistes **1** à **5** qui correspondent aux transfactions des vecteurs produisant des protéines de fusion adressées à la mitochondrie indiquent que ces séquences de mitogaligine suffisent à induire une libération cytosolique de cytochrome c.

A l'inverse, les vecteurs pMG-32_54 EGFP et pMG-31_46 EGFP qui n'adressent pas la mitogaligine à la mitochondrie, indiquent une forte diminution du cytochrome c cytosolique (piste **6** et **7**).

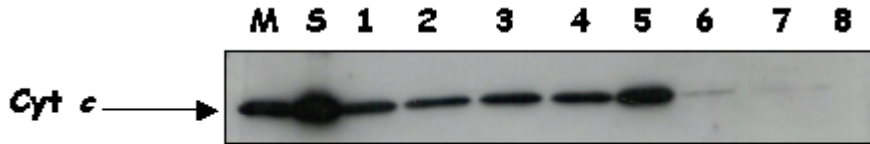


Figure 47 : L'expression transitoire de fragments de mitogaligine induit une libération cytosolique de cytochrome *c*.

Cellules HeLa transfectées avec des vecteurs d'expression eucaryotes : 1) pORF2-EGFP = mitogaligine-EGFP + cytogaligine, 2) pMG-31_54 EGFP (code les aa 31 à 54 de la mitogaligine en fusion avec EGFP), 3) pMG-31_47 EGFP, 4) pMG-31_48 EGFP, 5) pMG-31_49 EGFP, 6) pMG-32_54 EGFP, 7) pMG-31_46 EGFP, 8) pEGFP N3, M) Cytochrome *c* de cheval, S) Cellules traitées à la saponine. Les extraits cellulaires sont analysés sur un gel SDS-PAGE à 12% polyacrylamide, transférés sur membrane de nitrocellulose, et incubés avec de l'anti-cytochrome *c*.

1.3. Conclusion.

Ce résultat indique que la séquence d'adressage de la mitogaligine à la mitochondrie est suffisante pour induire le relargage de cytochrome *c* de la mitochondrie vers le cytosol.

2. Libération de cytochrome *c* associée à l'expression d'une seule ou des deux protéines codées par *galig*.

Les observations en microscopie de fluorescence des cellules transfectées par des vecteurs codant la mitogaligine-EGFP seule ont permis de constater que ces cellules présentent des altérations moins sévères de leur morphologie que pour les cellules transfectées avec pORF2-EGFP qui produit la mitogaligine-EGFP et la cytogaligine (figure 45 photo **B**). Les mitochondries apparaissent en particulier moins condensées. Ces données posent le problème du rôle de la cytogaligine dans l'induction de la mort cellulaire induite par *galig*. Il semble donc que la localisation de la mitogaligine seule à la mitochondrie ne soit pas suffisante pour induire la mortalité cellulaire même, s'il a été démontré que le signal de localisation mitochondrial de la mitogaligine était capable d'induire la fuite extra-mitochondriale de cytochrome *c* (figure 47). Ainsi, nous avons étudié par *western-blot* la distribution du cytochrome *c* dans des cellules transfectées par des vecteurs codant la mitogaligine et/ou la cytogaligine.

2.1. Matériel et méthodes.

2.1.a. Culture cellulaire, Transfection transitoire.

Les cellules HeLa sont mises en culture dans des boîtes 6 puits et transfectées avec une quantité de 5µg d'ADN/puits (chapitre 1, II.1.1.a) par les vecteurs :

- pORF2-EGFP codant la mitogaligine-EGFP et la cytogaligine
- pMG-EGFP codant la mitogaligine-EGFP
- pORF1-EGFP codant la cytogaligine -EGFP et la mitogaligine
- pCG-EGFP codant la cytogaligine-EGFP

Les contrôles sont constitués par des cellules non transfectées ou transfectées par pEGFP N3 codant EGFP et par des cellules traitées à la staurosporine (article chapitre 1, I).

2.1.b. Détection du cytochrome c cytosolique.

La mise en évidence *in vitro* de la forme dénaturée du cytochrome c est réalisée dans les lysats de cellules HeLa transfectées (article chapitre 1, I). L'immunodétection du cytochrome c se fait par chimioluminescence, à l'aide d'un anticorps de souris anti-cytochrome c (BD Biosciences PharMingen clone 7H8.2C12) utilisé au 1 : 2000^{ème}

2.2. Résultat.

La piste **5** (figure 48), est un contrôle correspondant au cytochrome c détecté dans le surnageant des cellules transfectées par le vecteur p EGFPN3.

Comme cela a déjà pu être observé, l'expression de *galig* induit le relargage cytosolique de cytochrome c mitochondrial pistes **1** et **3**. Par ailleurs, ces cellules montrent de profondes altérations morphologiques et meurent. D'une façon surprenante, la présence de cytochrome c cytosolique peut également être détectée dans le surnageant des cellules exprimant la mitogaligine seule ou la cytogaligine seule, pistes **2** et **4**.

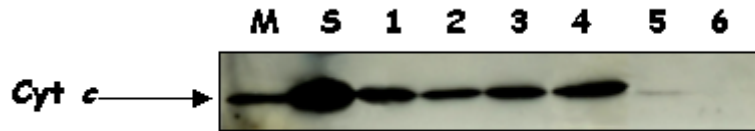


Figure 48 : L'expression transitoire de la mitogaligine ou de la cytogaligine induit une libération cytosolique de cytochrome *c*.

Cellules HeLa transfectées avec des vecteurs d'expression eucaryotes : 1) pORF2-EGFP = mitogaligine-EGFP + cytogaligine, 2) pMG-EGFP = la mitogaligine-EGFP 3) pORF1-EGFP = cytogaligine-EGFP + mitogaligine, 4) pCG-EGFP = la cytogaligine-EGFP, 5) pEGFP N3, 6) cellules non transfectées S) cellules traitées à la saponine, M) Cytochrome *c* de cheval. Les extraits cellulaires sont analysés sur un gel SDS-PAGE à 12% polyacrylamide, transférés sur membrane de nitrocellulose, et incubés avec de l'anti-cytochrome *c*.

2.3. Conclusion.

Bien que l'expression de *galig* soit toxique pour les cellules, ces résultats montrent que cette cytotoxicité ne peut pas être reliée uniquement à la libération extramitochondrial de cytochrome *c*. En effet, l'expression de la mitogaligine seule ou de la cytogaligine seule permet la détection de cytochrome *c* dans les surnageants des lysats cellulaires. Ce résultat est d'autant plus surprenant pour la cytogaligine qui présente une localisation majoritairement cytosolique et nucléaire. En revanche, l'expression d'une seule des deux protéines n'induit ni de modifications sévères de la morphologie des cellules ni la mort de ces cellules. Ainsi, il semble que la cytotoxicité du gène *galig* repose sur l'expression des deux protéines qu'il code : la mitogaligine et la cytogaligine. Mais, il apparaît également que la libération du cytochrome *c* ne constitue pas le seul effecteur de la cytotoxicité induite par *galig* puisque la production d'une seule des 2 protéines suffit au relargage de cet effecteur pro-apoptotique.

CHAPITRE 3 : Production d'anticorps dirigés contre la cytogaligine.

L'obtention de protéines recombinantes est indispensable pour la production d'anticorps et pour les études structurales que l'on souhaite développer ultérieurement.

Une première approche a été initiée en utilisant des vecteurs d'expression procaryotes (*E. coli*) produisant la cytogaligine et la mitogaligine fusionnées à l'extrémité C-terminale avec la MBP (Maltose Binding Protein). L'induction de l'expression des protéines de fusion chez *E. coli* fait apparaître un effet toxique qui se manifeste de façon différente selon que l'on produise la MBP-mitogaligine ou la MBP-cytogaligine. La MBP-mitogaligine provoque une inhibition complète de la croissance bactérienne dès l'induction avec l'IPTG (chapitre 1, article figure 10). La croissance des bactéries exprimant la MBP-cytogaligine, n'est quant à elle, pas altérée jusqu'à 3 heures post-induction. Par contre au-delà, la croissance des bactéries ralentit et les cellules bactériennes meurent. Ainsi, des temps courts d'induction ont permis de produire de la MBP-cytogaligine. La purification de cette protéine recombinante s'est trouvée être délicate, car la cytogaligine-MBP n'était pas correctement retenue sur les résines d'amylose. Cependant, des fractions enrichies de protéines recombinantes ont quand même permis d'initier un protocole d'immunisation chez la souris. Les premiers tests effectués avec les anti-sérums, ont permis de constater que les anticorps étaient majoritairement dirigés contre la MBP.

Une autre stratégie basée sur la construction d'un plasmide produisant la cytogaligine fusionnée à l'épitope 6xHis a été réalisée. Cette deuxième approche s'est avérée plus encourageante en terme de production et de purification. Un point essentiel étant la limitation du temps de production de la protéine. Une induction courte (3 heures) en IPTG a permis d'éviter les problèmes de cytotoxicité.

I. Production des protéines recombinantes chez *E. coli*.

1. Construction du vecteur pPROCLR (His-Cytogaligine).

Le vecteur est construit par PCR en réalisant un clonage à partir de la matrice pORF2-EGFP (codant la cytogaligine fusionnée à EGFP et la mitogaligine), grâce au couple d'amorces ci-dessous :

CLR-up 5' TCT AGA TCT TAT GAT GCG TTA TCT GGG TCT 3'

LB-Low 5' TCT AGA ATT CAG TGG CCC AGC AGG GGC GCC AT 3'

Les produits PCR digérés sont insérés dans le vecteur d'expression pTRCHis de (Novagen), et des bactéries *E. coli DH5α* sont transformées par le plasmide recombinant (méthode chapitre 2, I).

2. Production des protéines recombinantes comportant une "étiquette" Histidine.

1^{er} jour : Préculture de 45 ml de milieu LB-ampicilline à partir d'un clone sur boîte, à 37°C durant une nuit, sous agitation.

2^{ème} jour : Culture.

- **Ensemencement**, à 37°C sous agitation, de 2 erlenmeyers d'un litre de LB-ampicilline avec 20 ml de la préculture.

- **L'induction à l'IPTG** est réalisée lorsque la culture bactérienne a atteint une DO_{600nm} comprise entre 0,65 et 0,8. Au temps 0 de l'induction, le prélèvement d'un échantillon de 5 mL de culture bactérienne est effectué, mis en culture dans un tube de 50 ml à 37°C afin de constituer des témoins de non-induction. Le reste de la culture est induit avec de l'IPTG à 1 mM final pendant 3h à 37°C. Le temps d'induction est critique, il est important de ne pas aller au-delà de façon à éviter les problèmes de cytotoxicité.

- **Vérification de l'induction.** A la fin de la culture, 1 ml de bactéries induites et non induites sont centrifugés, puis repris dans 120 µl H₂O, 15 µl + 5 µl de solution de charge sont déposés sur gel dénaturant 14% acrylamide).

Le reste de la culture est centrifugé 20 min à 5000 rpm, les culots bactériens sont congelés à -20°C.

3^{ème} jour :

- **Reprise des culots** dans tampon phosphate (pH 7.8 Na₂HPO₄ 20 mM, NaCl 500 mM).

RESULTATS. Chapitre 3. Production d'anticorps anti-cytogaligine.

- **Sonication des bactéries** 5 fois 1 minute à 4°C. Les sonicats sont centrifugés (5000 rpm, 15 mn, 4°C), les surnageants sont recentrifugés (15000 rpm, 20 min, 4°C). Les surnageants issus de cette 2^{ème} centrifugation sont conservés pour l'étape de purification sur colonne.

- **Purification** : 1 à 2 ml de résine (ProBond resin, invitrogen) sont coulés dans la colonne laquelle est lavée avec 20 ml H₂O, équilibrée avec 20 ml de tampon phosphate de sodium pH7.8. Les échantillons sont déposés sur la colonne (vitesse de passage 0.75 ml/min) et lavés :

2 fois 10 ml de tampon phosphate pH 7.8

2 fois 10 ml de tampon phosphate pH 6

2 fois 10 ml de tampon phosphate pH 6 imidazole 20mM

Les protéines présentant une étiquette Histidine sont retenues sur la colonne.

- **Elution des protéines** retenues sur la colonne par le passage de tampons de force ionique croissante. Les éluats sont récoltés dans différents tubes (500 µl par tube) :

Tubes 1 à 7 : Tampon phosphate pH 6 imidazole 50mM

Tubes 8 à 14 : " " " imidazole 75mM

Tubes 15 à 21 : " " " imidazole 150mM

Tubes 22 à 35 : " " " imidazole 300mM

Quinze µl de certain éluat sont analysés sur gel d'acrylamide afin d'identifier les tubes contenant la protéine d'intérêt.

3. Immunisation.

L'immunisation a été réalisée par la société Eurogentec (Seraing, Belgique), elle a été effectuée sur deux lapins New Zealand. La protéine Histidine-cytogaligine a été fournie sous forme lyophilisée. L'injection nécessite une quantité de 50 à 100 µg de protéine recombinante His-cytogaligine par lapin.

Tableau 6 : Protocole standard d'immunisation.

Jour	0	14	28	38	56	66	87
Injection	1 ^{ère}	2 ^{ème}	3 ^{ème}		4 ^{ème}		
Saignées	pré immune			2 mL		2 + 20 mL	60mL

4. Immunodétection de la cytogaligine.

4.1. Test des anti-sérums par *Western-Blot*.

Les lapins identifiés par les numéros 3722 et 3724 ont été sélectionnés pour subir le protocole d'immunisation décrit ci-dessus. Le lapin 3724 a subi un dernier rappel avant la saignée finale.

4.1.a. Matériel et méthodes.

4.1.a.i. Culture cellulaire, transfection transitoire.

Les cellules HeLa sont mises en culture dans des boîtes 6 puits à raison de $2 \cdot 10^5$ cellules/puits et transfectées avec $6 \mu\text{g}$ d'ADN/puits (chapitre 1, II.1.1.a) avec les plasmides :

- pEGFP N3
- pORF1-EGFP codant la cytogaligine-EGFP et la mitogaligine
- pORF2-EGFP codant la mitogaligine-EGFP et la cytogaligine
- pCG-EGFP codant la cytogaligine-EGFP
- pgalig codant la mitogaligine et la cytogaligine

4.1.a.ii. Spécificité des sérums immuns et détection de la cytogaligine.

Les cellules sont lysées 24 heures après la transfection. La mise en évidence *in vitro* de la protéine cytogaligine fusionnée ou non à EGFP est réalisée dans les lysats cellulaires (chapitre 1, II.4.2.a.i). L'immunodétection de la cytogaligine se fait par chimioluminescence avec les sérums des saignées finales du lapin 3722 utilisé au 1 : 2000^{ème} et du lapin 3724 utilisé au 1 : 8000^{ème}. Un contrôle est effectué par une révélation avec un anticorps anti-EGFP utilisé au 1 : 5000^{ème} (anticorps monoclonal de souris 3E6 (A-11120) et 11E5 (A-11121), Molecular Probes).

4.1.b. Résultat.

Les deux sérums immuns ont été testés par *Western-blot* (figure 49 **A**, **B**). Les résultats obtenus montrent que les sérums anti-cytogaligine des lapins 3722 et 3724 immunisés avec la protéine recombinante Histidine-cytogaligine, fonctionnent en *Western-blot* et détectent la protéine cytogaligine-EGFP ou de la cytogaligine dans les extraits cellulaires. La taille attendue de la cytogaligine fusionnée à EGFP est de 38 kD, celle de la cytogaligine seule est de 11 kD.

La comparaison des *Westerns-blot* **A** et **B** (figure 49) permet de mettre en évidence que la spécificité des anti-sérums est semblable. En effet, l'expérience montre que des bandes identiques sont détectées dans les différentes pistes lors de la révélation des membranes avec le sérum anti-cytogaligine du lapin 3722 (figure 49 **A**) ou avec le sérum anti-cytogaligine du lapin 3724 (figure 49 **B**). Cependant, il convient de noter qu'avec l'anti-sérum 3722 (**A**), une bande non spécifique de faible intensité est détectée. Cette bande apparaît dans toutes les pistes y compris la piste **1** où l'échantillon déposé correspond à des extraits de cellules HeLa non transfectées. Cette protéine cellulaire qui apparaît croiser avec l'anticorps anti-cytogaligine, n'avait pas été observée lors des premiers tests réalisés avec le sérum pré-immun (résultat non montré). Sur la base de ces résultats, nous pouvons conclure que l'anti-sérum obtenu avec le lapin 3724, (ayant subi une immunisation supplémentaire par rapport au lapin 3722), a permis l'obtention d'anticorps polyclonaux anti-cytogaligine présentant une sensibilité supérieure à ceux du lapin 3722 puisque nous pouvons l'utiliser à une dilution plus importante (1 : 8000^{ème} contre 1 : 2000^{ème}).

Les pistes **2** (figure 49 **A**, **B**) correspondant à des extraits de cellules HeLa transfectées par le vecteur codant EGFP montrent que les anti-sérums ne croisent pas avec cette protéine.

Les vecteurs p ORF2-EGFP (piste **4**) et p galig (piste **6**), produisent chacun la cytogaligine. Les sérums anti-cytogaligine ont permis de détecter la protéine dans les lysats des cellules transfectées avec ces vecteurs puisqu'une bande est révélée à la taille attendue d'environ 11 kD.

Les vecteurs p ORF1-EGFP (piste **3**) et p CG-EGFP (piste **5**), produisent chacun la protéine de fusion cytogaligine-EGFP. Les résultats obtenus montrent que la cytogaligine-EGFP est présente à la taille attendue de 38 kD dans les extraits protéiques des cellules transfectées par ces deux vecteurs. Cependant, les deux sérums révèlent dans les pistes **3** et **5** une deuxième bande à 35 kD. La protéine figurée par cette bande ne semble pas être la conséquence d'une révélation non spécifique puisqu'elle n'est pas détectée dans les pistes **4** et **6**. Ainsi, ce résultat laisse supposer que cette bande pourrait probablement représenter une forme tronquée de la cytogaligine-EGFP. En effet, nous ne pouvons pas exclure que la cytogaligine ne subisse un processus de dégradation lors de l'extraction des protéines.

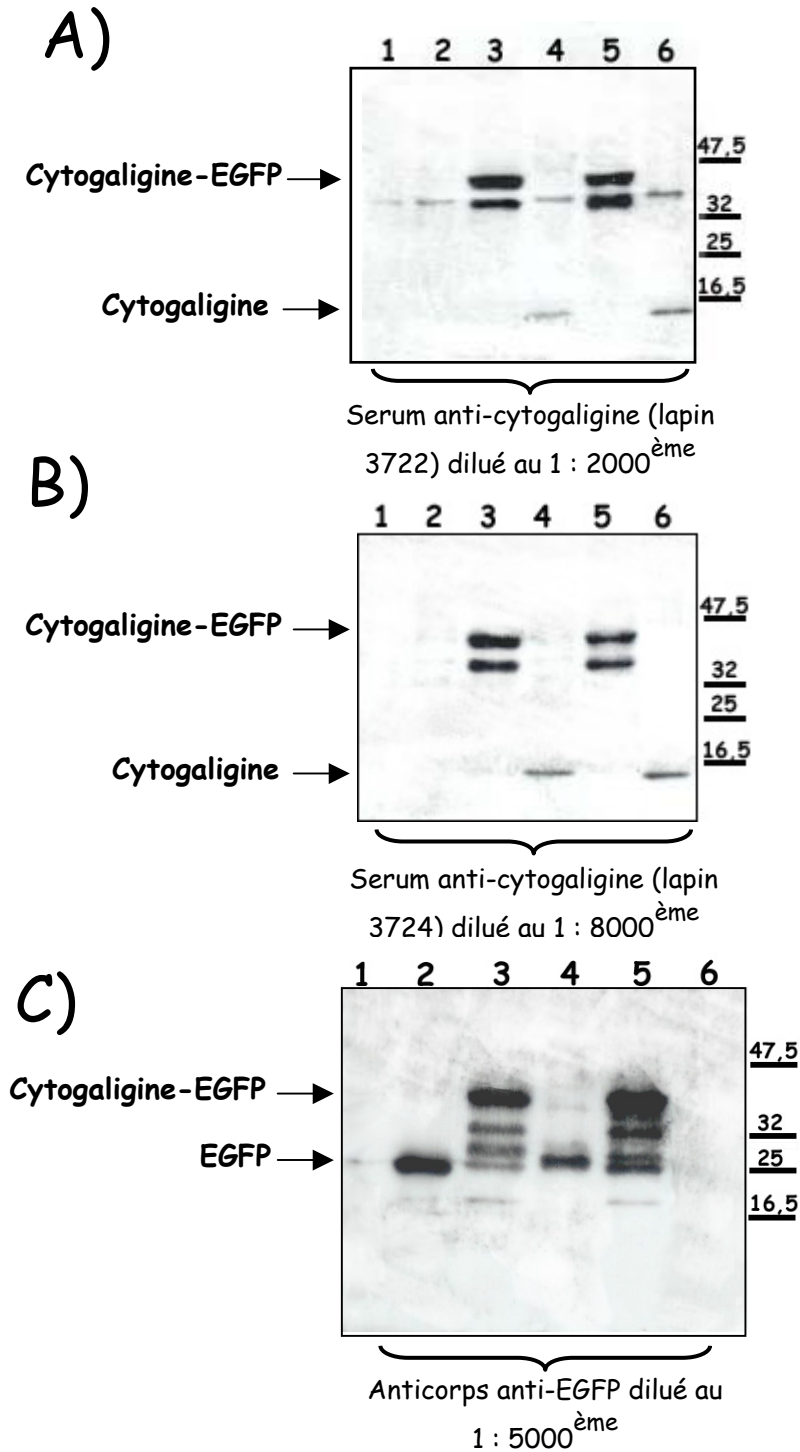


Figure 49 : Immunodétection de la protéine cytogaligine par les sérums des lapins 3722 et 3724.

Cellules HeLa non transfectées (1), ou transfectées par les vecteurs codant EGFPN3 (2), la cytogaligine-EGFP + la mitogaligine (3), la mitogaligine-EGFP + la cytogaligine (4), la cytogaligine-EGFP (5), la mitogaligine et la cytogaligine (6). Les extraits cellulaires sont analysés sur un gel SDS-PAGE à 12% polyacrylamide (taille en Kda), transférés sur membrane de nitrocellulose, et incubés avec **A-** le sérum de la saignée finale du lapin 3722 au 1 : 2000^{ème}, **B-** le sérum de la saignée finale du lapin 3724 au 1 : 8000, **C-** l'anticorps anti-EGFP au 1 : 5000^{ème}.

Afin de vérifier ces résultats, un troisième *western-blot*, réalisé avec les mêmes échantillons, a été révélé avec l'anticorps anti-EGFP (figure 49 **C**). L'échantillon déposé sur la piste **2** (figure 49 **C**) correspond aux extraits des cellules HeLa transfectées par le vecteur codant uniquement EGFP. La révélation par l'anti-EGFP permet bien la détection de la protéine EGFP à la taille attendue de 27 kD.

Le vecteur pgalig produit la mitogaligine et la cytogaligine. Ainsi, comme attendu, aucune bande n'est révélée avec l'anticorps anti-EGFP dans la piste **6 (C)**.

La cytogaligine-EGFP est détectée à la taille attendue de 38 kD dans la piste **3 (C)** par l'anti-EGFP. Néanmoins, la révélation rend compte aussi de la présence de bandes correspondant à des protéines de masses moléculaires apparentes inférieures à celle de la cytogaligine-EGFP. Ce résultat renforce l'idée de coupures de la cytogaligine-EGFP. Le clivage pourrait alors s'effectuer du côté de la cytogaligine. Ce résultat est confirmé piste **5 (C)** où nous observons la présence des mêmes bandes discrètes.

Le vecteur pORF2-EGFP (piste **4**) produit la mitogaligine-EGFP. La révélation par l'anticorps anti-EGFP devrait permettre la détection d'une bande à la taille de 38 kD. De manière surprenante, la bande majoritaire correspondant à la mitogaligine-EGFP n'est pas détectée par l'anticorps anti-EGFP à la taille attendue de 38 kD. La taille est voisine mais un peu supérieure à celle de EGFP seule (27 kD, piste **2**). Il convient de noter que l'observation en microscopie de fluorescence des cellules exprimant la mitogaligine fusionnée à l'EGFP, permet bien de constater que la fluorescence verte (production de la mitogaligine) est retrouvée exclusivement dans les mitochondries. Ainsi, comme cela a été proposé pour la cytogaligine, la mitogaligine pourrait subir un clivage spécifique ayant pour conséquence une réduction importante de la taille de la protéine de fusion. Une autre probabilité serait que la mitogaligine subisse un processus de dégradation lors de l'extraction des protéines.

4.2. Utilisation des sérums anti-cytogaligine en immunofluorescence.

4.2.a. Matériel et méthodes.

4.2.a.i. Culture cellulaire, transfection transitoire.

Les cellules HeLa sont mises en culture sur des lamelles dans des boîtes 12 puits à raison de $8 \cdot 10^4$ cellules/puits et transfectées avec 4 μ g d'ADN/puits (chapitre 1, II.1.1.a) avec les plasmides :

- pDsRED2 codant la DsRED2
- pORF2-DsRED2 codant la mitogaligine-DsRED2 et la cytogaligine
- pMG-DsRED2 codant la mitogaligine-DsRED2
- pORF1-DsRED2 codant la cytogaligine-DsRED2 et la mitogaligine
- pgalig : vecteur contenant l'ADNc de *galig*,
- pCG-galig : vecteur obtenu à partir du vecteur p galig par mutation ponctuelle des codons d'initiation de la mitogaligine, et codant la cytogaligine.
- pMG-galig : vecteur obtenu à partir du vecteur p galig par mutation ponctuelle des codons d'initiation de la cytogaligine, et codant la mitogaligine.

4.2.a.ii. Marquage des cellules par les anticorps anti-cytogaligine.

Quarante huit heures après transfection, les cellules cultivées sur lamelles subissent le protocole suivant :

Lavage 5 minutes sous agitation au PBS

Fixation des cellules : PFA 4%, 5 minutes à 37°C



Perméabilisation des cellules : 3 lavages PBS-SAB 2% Saponine 0,1%,
5 minutes sous agitation à température ambiante



Incubation avec anticorps primaire :

Anti-cytogaligine dilué au 1:2000^{ème} (lapin 3722) en PBS-BSA 2%-Saponine 0,1%,
30-45 minutes, température ambiante en chambre humide



Lavage 3 fois 5 minutes sous agitation dans PBS-BSA 2%-Saponine 0,1%

Incubation avec l'anticorps secondaire :

Chèvre anti-lapin IgG(H+L) couplé à la FITC (Interchim, France) dilué au 1 :200^{ème} en
PBS-BSA 2%-Saponine 0,1%, à température ambiante, 30 min en chambre humide



Lavage 1 fois dans PBS-BSA 2%-Saponine 0,1% ;
2 fois 5 min en PBS à température ambiante sous agitation



Rinçage des lamelles à l'eau distillée

Montage : les lamelles sont retournées sur la lame où 15 µl de milieu de montage VECTASHIELD® (VECTOR laboratories, USA) ont été déposés
L'excédent de liquide est épongé et la lamelle est scellée au vernis.



Analyse en microscopie de fluorescence.

4.2.b. Résultat.

4.2.b.i. Contrôles.

La transfection par le vecteur pDsRED2 montre la localisation attendue de la DsRED2, la fluorescence rouge est diffuse dans le noyau et le cytoplasme (figure 50 **A**, colonne **DsRED2**). Les cellules transfectées produisant la DsRED2 présentent un léger bruit de fond. Le marquage en vert (figure 50 **A**, colonne **FITC**) apparaît très faible et très diffus. De plus, l'anti-sérum du lapin 3722 ne reconnaît pas la protéine DsRED2. Dans les cellules non transfectées, le marquage apparaît très faible et très diffus.

Les cellules transfectées par pMG-DsRED2 produisent la mitogaline fusionnée à la protéine reporteur DsRED2. Les cellules présentent la localisation attendue de la protéine de fusion, la fluorescence rouge de la mitogaline-DsRED2 est associée aux mitochondries (figure 50, **B** colonne **DsRED2**). L'absence de marquage en vert dans les cellules transfectées (figure 50, **B** colonne **FITC**) atteste que l'anti-sérum ne reconnaît pas la mitogaline-DsRED2.

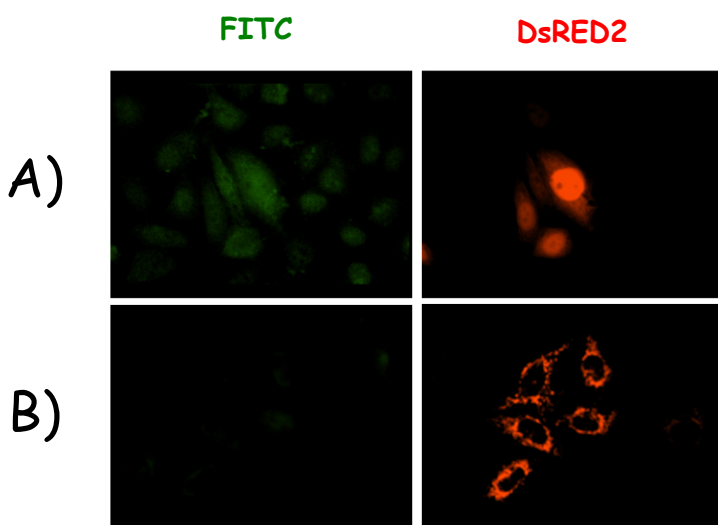


Figure 50 : Contrôle de la spécificité de reconnaissance de l'anti-sérum de lapin 3722.

Les cellules HeLa sont observées en microscopie de fluorescence 48h après transfection du vecteur pDsRED2, codant la DsRED2 (A, colonne DsRED2) et pMG DsRED2, codant la mitogaline-DsRED2 (B, colonne DsRED2). Le bruit de fond lié à la fixation non spécifique de l'anti-cytagaline apparaît très faiblement marqué et diffus (colonne FITC). De même, l'immun sérum 3722 ne reconnaît pas la mitogaline-DsRED2.

4.2.b.ii. Transfection des cellules HeLa par un vecteur codant la cytogaligine en fusion avec l'EGFP.

La figure 51 montre des cellules transfectées avec pORF2-DsRED2. Les cellules transfectées peuvent de ce fait exprimer la mitogaligine-DsRED2 ainsi que la cytogaligine. La morphologie de ces cellules diffère selon leur stade d'avancement dans le processus de mort.

La localisation de la cytogaligine est associée à la fluorescence verte (l'anticorps anti-cytogaligine est reconnu par l'anticorps secondaire couplé à la fluorescéine, figure 51 colonne **FITC**). Dans la mesure où la mitogaligine-DsRED2 n'est pas reconnue par l'anti-sérum du lapin 3722 (figure 50, ligne **B** colonne **DsRED2**), nous pouvons conclure que le sérum contient bien des anticorps spécifiques de la cytogaligine. Ce résultat est important car il nous permet d'envisager son utilisation dans de nouvelles expériences.

La localisation de la cytogaligine révélée par l'antisérum, soulève cependant d'autres questions. En effet, le marquage par l'anticorps anti-cytogaligine fait essentiellement apparaître une localisation mitochondriale de la cytogaligine, révélée par la co-localisation avec la mitogaligine-DsRED2 (figure 51, colonne **FITC + DsRED2**). Il convient de noter également une fluorescence verte très diffuse et de faible intensité dans le cytosol et le noyau (figure 51 ligne **A, B** colonne **FITC**). Ce constat est *a priori* surprenant puisque la localisation de la cytogaligine-EGFP, précédemment décrite ((Guittaut *et al.*, 2001) et figure 52), s'était révélée essentiellement cytosolique et nucléaire, le marquage mitochondrial étant nettement plus faible. Ce point est discuté en conclusion du chapitre.

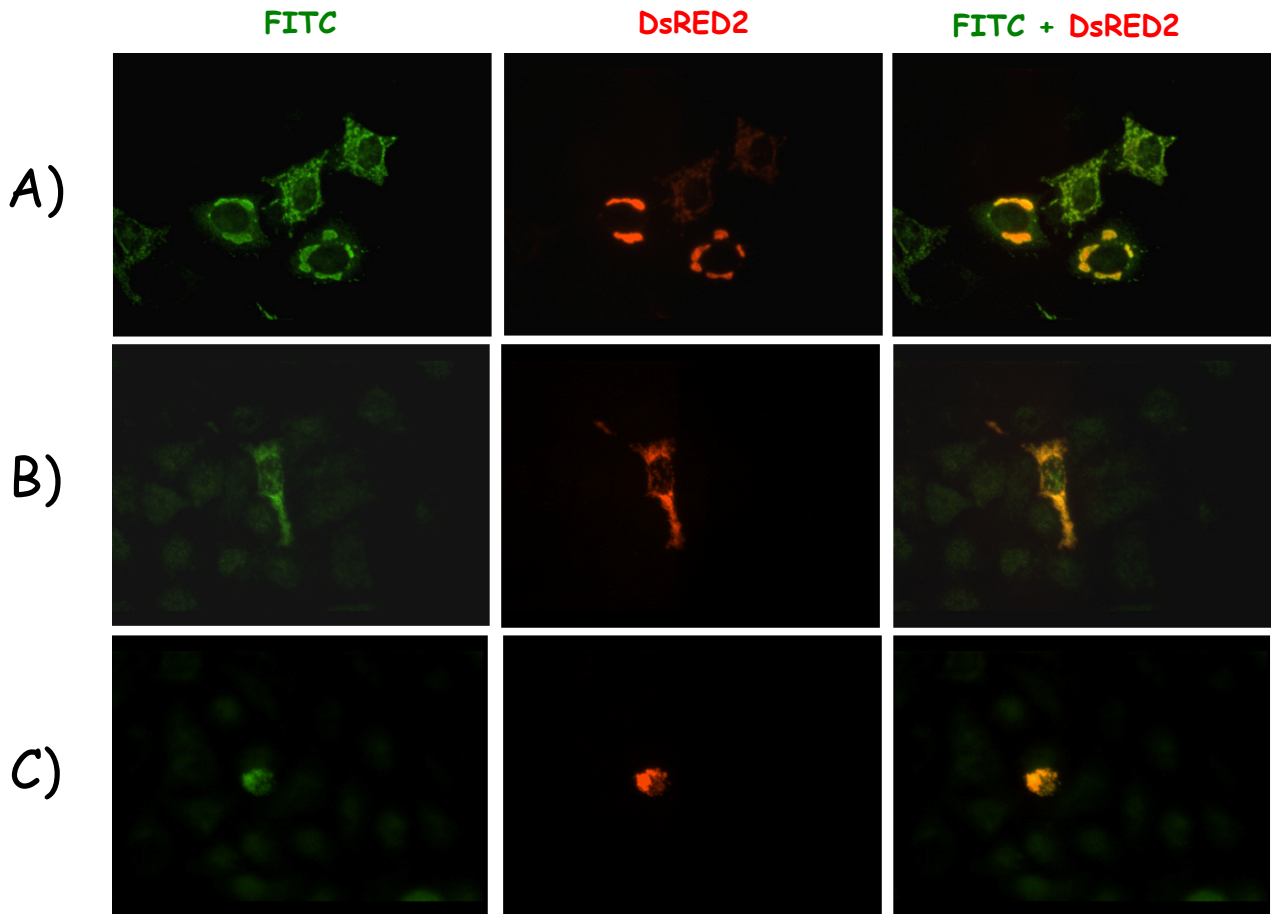


Figure 51 : Immunomarquage de la cytogaligine par l'anti-sérum du lapin 3722.

Les cellules HeLa sont transfectées avec le vecteur pORF2-DsRED2 codant la mitogaligine-DsRED2 et la cytogaligine (A, B, C). 48h après transfection, les cellules sont observées en microscopie de fluorescence pour l'expression de la mitogaligine-DsRED2 (colonne **DsRED2**) et pour la détection de la cytogaligine par l'anti-sérum du lapin 3722 (colonne **FITC**). La colonne de droite représente la superposition des photographies des colonnes FITC et DsRED2 (**FITC + DsRED2**).

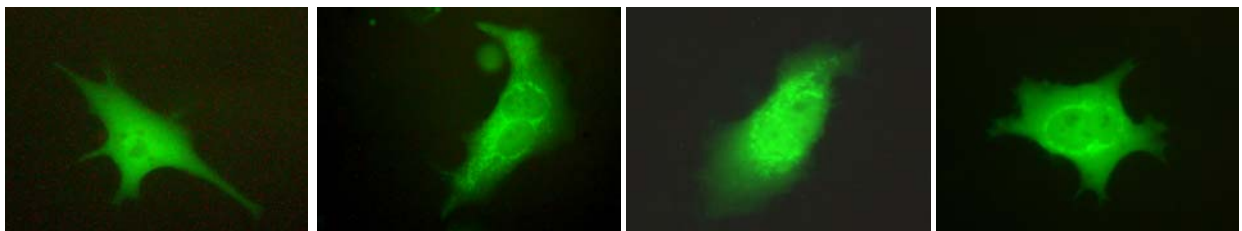


Figure 52 : Distribution intracellulaire de la cytogaligine-EGFP.

Les cellules HeLa sont transfectées avec le vecteur pORF1-EGFP codant la cytogaligine-EGFP et la mitogaligine. 24h après transfection, les cellules sont observées en microscopie de fluorescence pour l'expression de la cytogaligine fusionnée à EGFP.

4.2.b.iii. Transfection des cellules HeLa par des vecteurs codant la cytogaligine.

Les anticorps anti-cytogaligine ont également été testés sur des cellules HeLa transfectées par le vecteur pgalig contenant l'ADNc de *galig* et codant les deux protéines mitogaligine et cytogaligine non fusionnée à un gène reporteur (figure 53 **A, B**).

La fluorescence associée à la reconnaissance de la cytogaligine présente une localisation similaire à celle de la figure 51 où les cellules étaient transfectées par un vecteur codant la mitogaligine-DsRED2 et la cytogaligine. Là encore, on remarque une fluorescence ponctiforme ainsi qu'une fluorescence nucléaire plus faible.

Des cellules ont également été transfectées par pCG-galig (figure 53, **C**). Ce vecteur a été obtenu par mutation ponctuelle du codon d'initiation de traduction de la mitogaligine. La cellule exprime ainsi la cytogaligine seule et montre une localisation intracellulaire identique à celle observée en **A** et **B**

Le vecteur pMG-galig (figure 53, **D**) a été obtenu par mutation ponctuelle des deux codons ATG contigus de la cytogaligine et ne code, *a priori*, la mitogaligine. Ainsi, nous nous attendions à observer un résultat négatif pour le marquage FITC. De manière surprenante, les cellules transfectées présentent une fluorescence typique de celle associée à la cytogaligine et déjà observée en **A, B** et **C**. Dans la mesure où les expériences précédentes indiquent l'absence de reconnaissance de la mitogaligine par l'antisérum 3722, ce résultat implique que le plasmide soit capable de produire la cytogaligine. Ceci laisse supposer la présence d'un autre site d'initiation de traduction de la cytogaligine. Ce point sera discuté dans le chapitre suivant.

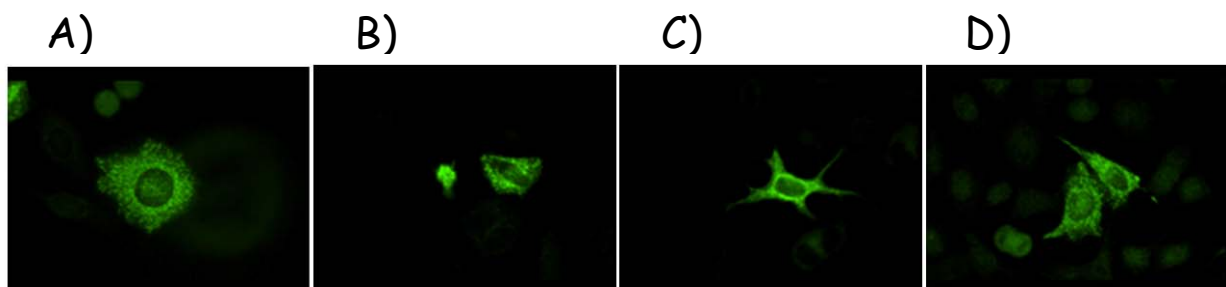


Figure 53 : Immunomarcage de la cytogaligine.

Les cellules HeLa sont transfectées avec le vecteur p galig codant la mitogaligine et la cytogaligine (**A, B**), pCG-galig vecteur codant la cytogaligine (**C**), pMG-galig vecteur codant la mitogaligine (**D**). 48h après transfection, les cellules sont observées en microscopie de fluorescence pour l'expression des galigines et la détection de la cytogaligine par l'anticorps anti-cytogaligine couplé à la fluorescéine.

4.2.c. Conclusion.

Les premières observations de la localisation de la cytogaligine fusionnée au gène reporteur de EGFP avaient permis de conclure à une localisation essentiellement cytosolique et nucléaire de la protéine de fusion, sans pouvoir exclure totalement une certaine association avec les mitochondries.

L'utilisation des anticorps anti-cytogaligine sur des cellules transfectées par un vecteur permettant l'expression de la cytogaligine non fusionnée à EGFP montre que cette protéine présente une localisation essentiellement mitochondriale, alors que la fluorescence cytosolique et nucléaire est plus faible. Les cellules transfectées par un vecteur codant la cytogaligine-EGFP montrent une localisation nucléaire et cytosolique de la cytogaligine plus forte que celle observée après le marquage avec les anticorps anti-cytogaligine. Les résultats de ces expériences posent le problème de la localisation intracellulaire de la cytogaligine, laquelle devant être davantage précisée.

On peut poser la question de savoir si la protéine EGFP serait en mesure de provoquer une délocalisation de la cytogaligine, de sorte que celle-ci apparaisse plus cytosolique. Toutefois, il convient de noter que les expériences de transfection des formes fusionnées de la cytogaligine sont observées sur des cellules vivantes alors que les expériences d'immunofluorescence requièrent la perméabilisation et la fixation des cellules. Il serait donc possible que cela entraîne une certaine fuite de la cytogaligine soluble, ce qui pourrait diminuer l'intensité du marquage cytosolique.

Chapitre 4 : Etude de l'initiation de traduction de la cytogaligine.

I. Introduction.

Dans le chapitre précédent, nous avons mis en évidence l'efficacité des anticorps anti-cytogaligine à marquer la cytogaligine dans des cellules transfectées. Toutefois, la transfection du vecteur pMG-galig a révélé également un marquage positif. Ce résultat est surprenant dans la mesure où ce plasmide est attendu produire uniquement la mitogaligine. En effet, dans ce plasmide, les sites d'initiation de traduction potentiels de la cytogaligine ont été mutés. Ainsi, ces dernières observations posent le problème de l'initiation de traduction de la cytogaligine. Afin de comprendre dans quel contexte se déroule la traduction des galigines, la structure du gène dans la région de l'initiation de traduction des galigines est schématisée ci-dessous.

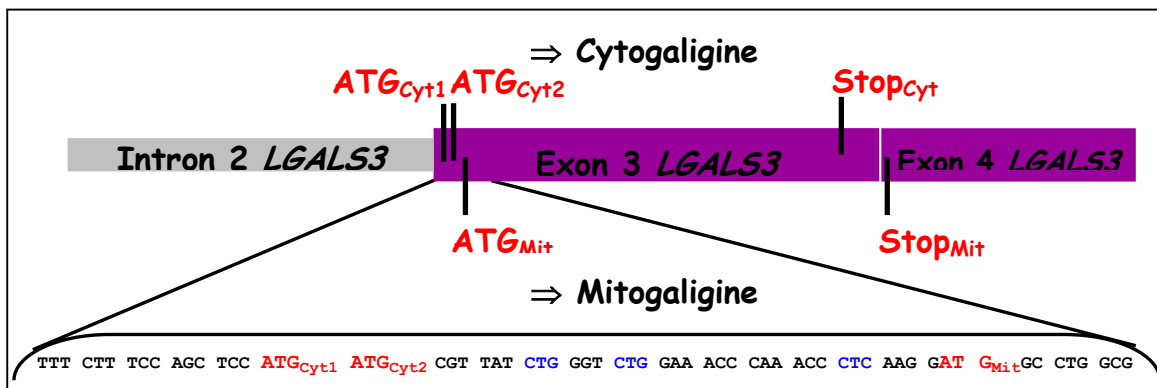


Figure 54 : Structure de l'ADNc galig dans la région de l'initiation de traduction des galigines.

L'ADNc du gène *galig* se compose d'une partie de la séquence de l'intron 2 et de l'exon 3 du gène de la galectine-3, qui contient les ORFs des galigines. La partie intron 2 conservée dans l'ARNm de *galig* correspond donc à l'ARNm leader. La région agrandie concerne la séquence contenant les deux codons contigus d'initiation de traduction de la cytogaligine : ATG_{Cyt1} , ATG_{Cyt2} , et de la mitogaligine : ATG_{Mit} . Cette séquence contient aussi trois codons leucine (en bleu).

L'ADNc du gène *galig* a été utilisé pour construire le vecteur d'expression pgalig. Ce plasmide a servi de base pour construire des vecteurs modifiés. Des expériences antérieures ont montré notamment que la délétion de toute la séquence correspondant à l'intron 2 de *LGALS3* permettait toujours la production de la mitogaligine et de la cytogaligine (non montré). Ainsi, le site d'initiation probable de la cytogaligine pouvait être soit l'un ou l'autre des deux AUG contigus localisés en position +5 +10 sur la partie correspondant de l'exon 3 (voir séquence figure 54).

- La délétion de l'ATG_{Mit} de la mitogaligine ne permet plus la production de la protéine et démontre que l'utilisation de cet ATG est essentiel pour sa traduction (non montré).

- La délétion des deux ATG_{Cyt1,Cyt2} contigus de la cytogaligine permet encore, à un niveau plus modéré, la production de la cytogaligine (non montré).

Le fait que l'initiation de traduction de la cytogaligine ne soit pas complètement inhibée, a été attribuée à la présence de trois codons leucine (figure 54) présents en aval des deux ATG_{Cyt1,Cyt2}. La délétion de ces trois codons leucine entraîne une diminution supplémentaire de la production de la cytogaligine. Il est connu que les codons leucine peuvent être des sites d'initiations alternatifs.

L'interprétation de ce résultat a reposé sur le fait que les codons ATG de la cytogaligine se trouvaient dans un contexte d'initiation de traduction faible (absence de séquence Kozak consensus) (Kozak, 1987; Kozak, 1997) et permettait ainsi une initiation de traduction sur des codons alternatifs. De plus, il semblait cohérent que ces codons soient dans un contexte d'initiation faible puisque cela autorisait l'initiation de traduction de la mitogaligine.

Le vecteur pMG-galig a été obtenu à partir du plasmide pgalig par mutations ponctuelles des deux codons ATG_{Cyt1,Cyt2} contigus et des codons leucine (CTG et CTC) de la cytogaligine. On s'attend, à ce que la production de la cytogaligine ne soit pas possible, lors de la transfection des cellules par ce vecteur. Contre toute attente, les expériences d'immunofluorescences ont prouvé le contraire (figure 53 photos **D**). Ces observations laissent entendre qu'il doit exister un autre site d'initiation de traduction pour la protéine. Ce site d'initiation de traduction pourrait se situer dans l'intron 2. Huit codons AUG sont identifiés dans la séquence leader de l'ARNm de *galig*. Tous sont associés à des phases de lecture très courtes, de quelques aa seulement (figure 55). De plus, on rappelle que la délétion de cette séquence leader ne perturbe pas la production de la cytogaligine (non montré).

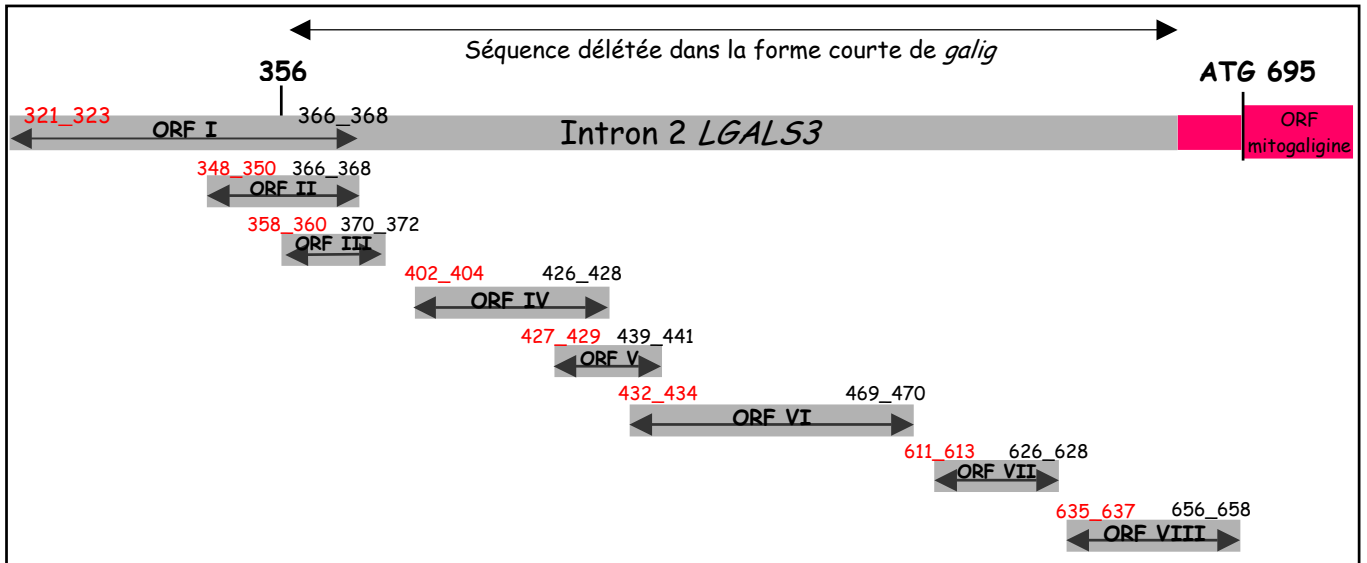


Figure 55 : Phases de lecture ouvertes présentes dans la région 306 à 695 de l'intron 2 du gène *LGALS3*.

Les 8 codons initiateurs AUG (nombres en rouge) sont associés à de courtes phases de lecture ouvertes (ORF I à ORF VIII) localisés dans l'intron 2 de *LGALS3*, lequel contient le promoteur de *galig* et ses séquences régulatrices. La numérotation correspond au positionnement des codons ATG par rapport au nucléotide +1 de l'intron 2 du gène de la galectine-3. Les sites d'initiation de transcription sont localisés avant le nucléotide 300.

Néanmoins, il faut prendre en compte que l'ARNm de *galig* peut exister sous deux formes: une forme longue et une forme courte (figure 32) résultant d'un épissage interne de la séquence non traduite du transcrit (correspondant aux nucléotides 356 à 650 de l'intron 2). Après l'épissage conduisant à la forme courte de l'ARNm de *galig*, 6 des 8 AUG sont éliminés. Les deux AUG restants sur la forme courte de l'ARNm (nucléotides 321_323 et 348_350) se retrouvent alors en phase avec l'ORF de la cytogaligine. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que ces codons AUG, bien que présents dans un contexte Kozak faible, soient utilisés pour l'initiation de la traduction de la cytogaligine.

Une nouvelle étude a alors été initiée dans le but de déterminer si ces codons AUG pouvaient effectivement être utilisés en tant que sites d'initiation de traduction. Pour réaliser ces expériences, nous sommes partis d'un vecteur disponible au laboratoire qui avait été construit pour caractériser les séquences régulatrices du gène *galig*. Ce vecteur est schématisé figure 56.

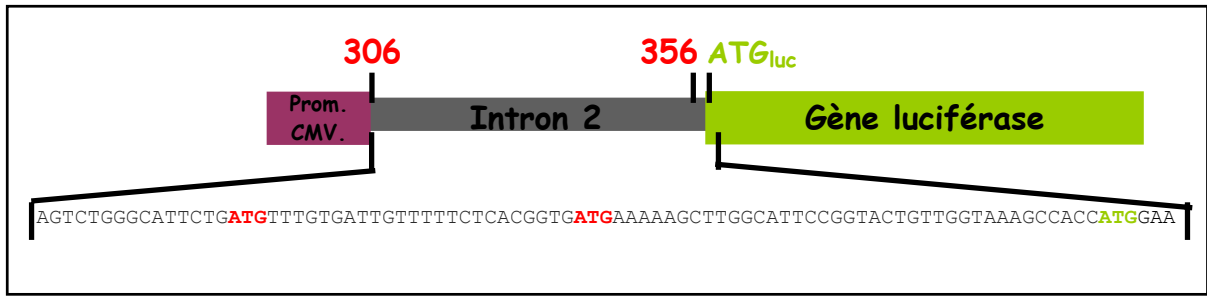


Figure 56 : Structure du vecteur pCMV306-356luc.

Le promoteur CMV est localisé en amont de la séquence comportant les nucléotides 306 à 356 de l'intron 2 du gène *LGALS3* (ARNm leader de *galig*) et du gène rapporteur luciférase. Le nucléotide 356 correspondant au site d'épissage en 5' a été mis en évidence dans l'ARNm court de *galig*. Les deux codons ATG en rouge correspondent aux nucléotides 321_323 et 348_350 de l'intron 2, l'ATG en vert correspond au codon initiateur de traduction de la luciférase.

Dans ce vecteur d'expression, l'ARNm de la luciférase possède un ARNm leader correspondant à la séquence 306 à 356 de l'intron 2. Dans cette séquence, on retrouve les deux AUG_{321_323} et AUG_{348_350}. Ainsi, l'ATG_{luc} est précédé des deux ATG de la séquence leader du petit ARNm de *galig*.

Ce vecteur montrait une activité luciférase relativement faible, lorsqu'on la comparait à celle d'un vecteur ne contenant pas la séquence 306 à 356 de l'intron 2. Une analyse détaillée de la séquence de ce vecteur fait apparaître que les ATG_{321_323} et ATG_{348_350} de l'intron 2 sont en phase l'un avec l'autre mais sont dans un cadre de lecture différent de celui de la luciférase. Ces ORF s'arrêtent au début de la luciférase en aval de l'ATG_{luc}.

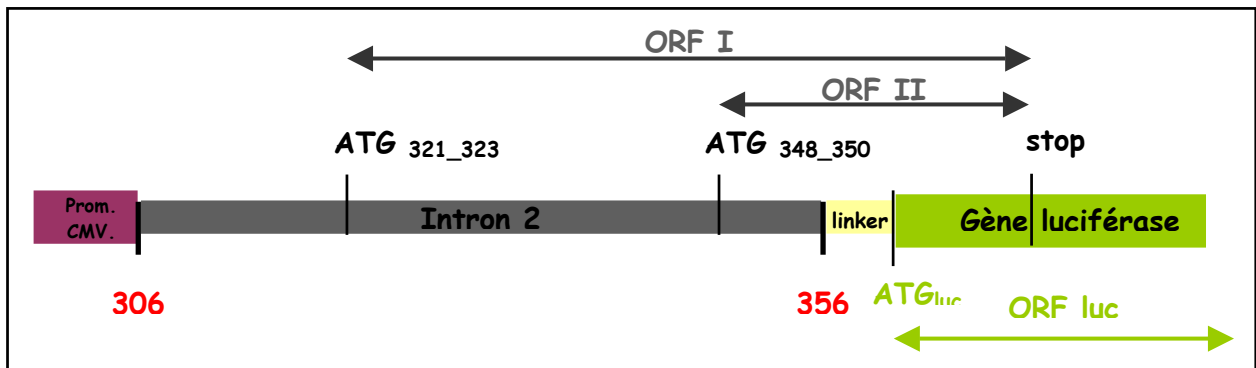


Figure 57: Schéma détaillé du vecteur pCMV306-356luc.

Le promoteur CMV est localisé en amont de la séquence comportant les nucléotides 306 à 356 de l'intron 2 du gène *LGALS3* et du gène rapporteur luciférase. Les deux codons ATG_{321_323} et ATG_{348_350} sont associés respectivement aux ORFI et ORFII. Le nucléotide 356 correspond à un site donneur d'épissage conduisant à la production du petit ARNm de *galig*. Les deux ORF I et II sont dans un même cadre de lecture.

En prenant ces points en considération, on peut imaginer que l'un ou l'autre des codons ATG_{321_323} ou ATG_{348_350} est utilisé pour initier la traduction des ORFI et ORFII. Ceci pourrait expliquer la faible activité luciférase du vecteur pCMV306_356luc, le ribosome étant déjà mobilisé lorsqu'il arrive au niveau de l'ATG_{luc}.

Deux constructions ont été réalisées afin de tester cette hypothèse :

➤ Un nucléotide adénine (A) a été inséré en position 356 de manière à mettre en phase les ORFs initiés à partir des ATG_{321_323} ou ATG_{348_350} et l'ATG de la luciférase. Dans ce cas, si l'un ou l'autre des deux ATG est utilisé pour initier la traduction, nous pouvons nous attendre à constater une augmentation de l'activité luciférase, car il y aurait possibilité de production d'une luciférase chimère.

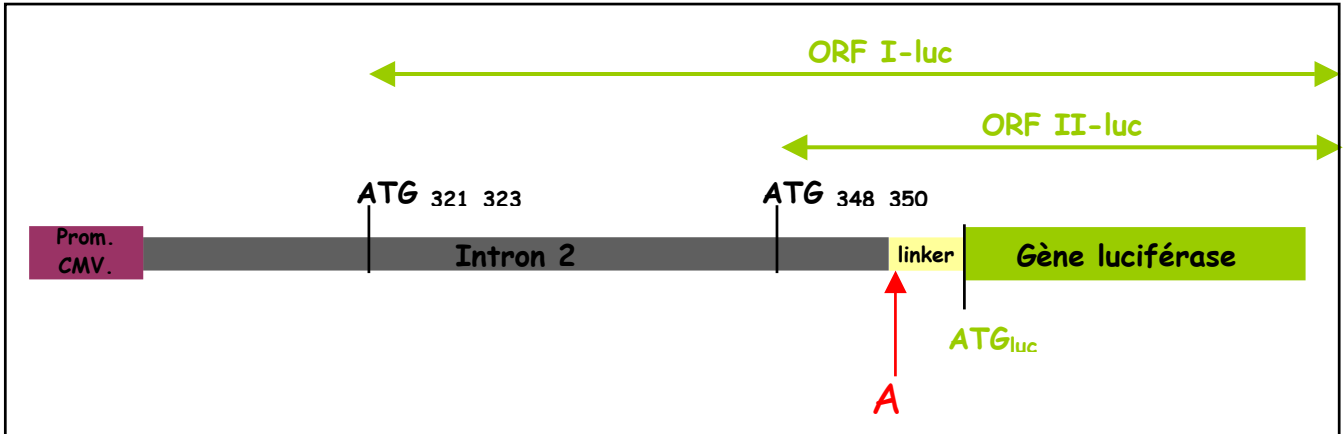


Figure 58 : Structure du vecteur p356ins-A.

Le promoteur CMV est localisé en amont de la séquence comportant les nucléotides 306 à 356 de l'intron 2 du gène *LGALS3* et du gène rapporteur luciférase. L'insertion du nucléotide A (en rouge) en position 356 permet de mettre en phase les ORF I et ORFII avec l'ORF de la luciférase. Le vecteur ainsi construit présente les séquences de l'intron 2 fusionnées au gène rapporteur luciférase.

➤ Les nucléotides (TAG) ont été incorporés en position 354, 355, 356 de manière à introduire un codon STOP, 3 nucléotides après l'ATG_{348_350}. Dans ce cas, l'ATG_{luc} se trouve en aval de la première phase de lecture. Le ribosome pourrait ainsi se trouver en mesure de ré-initier la traduction et nous devrions alors observer également une augmentation de l'activité luciférase.

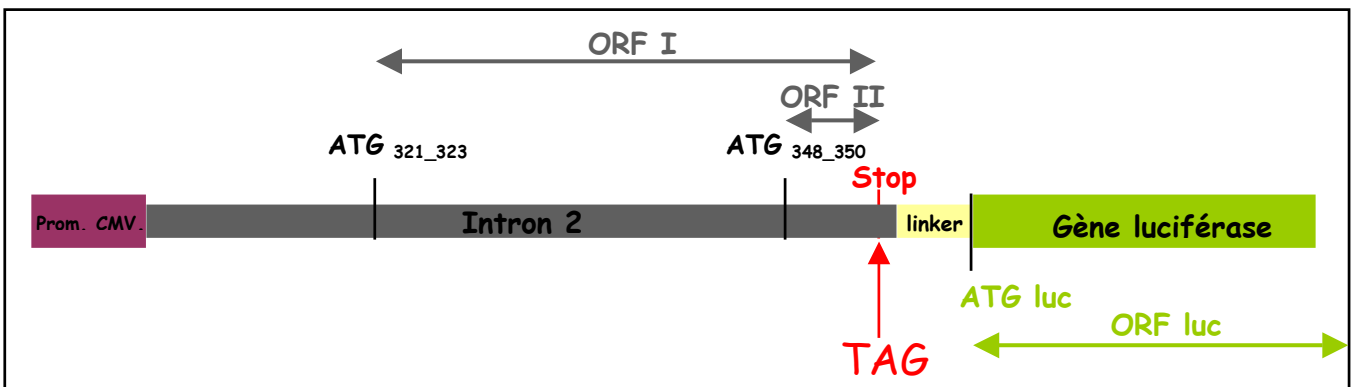


Figure 59 : Structure de vecteur p356ins-STOP.

Le promoteur CMV est localisé en amont de la séquence comportant les nucléotides 306 à 356 de l'intron 2 du gène *LGALS3* et du gène rapporteur luciférase. L'insertion des nucléotides TAG (en rouge) en position 354, 355, 356 introduit un codon STOP, ce qui raccourcit les ORFI et ORFII associés respectivement aux ATG_{321_323} et ATG_{348_350}. Le vecteur ainsi construit ne permet plus la traduction des ORF I et II fusionnées au gène rapporteur luciférase.

II. Initiation de traduction de la cytogaligine dans l'ARNm leader du petit ARNm de *galig*.

1. Matériel et méthodes.

1.1. Constructions des différents vecteurs.

1.1.a. Vecteur matrice.

Le vecteur utilisé en tant que matrice pour les différentes constructions est pCMV306-365luc. Ce vecteur construit au laboratoire a été réalisé par insertion des séquences 306 à 356 de l'intron 2 du gène *LGALS3* dans le vecteur pCMV3-Luc et contient le gène de la Luciférase de *photinus pyralis* (figure 57).

1.1.b. Principe de la construction des vecteurs mutés.

Les mutations sont introduites dans les plasmides par la technique de PCR à partir du vecteur matrice pCMV306-356luc. Les amorces utilisées pour la construction des vecteurs d'expression eucaryotes sont porteuses des mutations (insertion d'un A ou d'un codon STOP). La séquence 306 à 356 de l'intron 2 est amplifiée par PCR avec les amorces CMVpromF contenant le site de restriction pour l'enzyme *NdeI* (nucléotides soulignés : CATATG) et les amorces 342-356Ins-A et 342-356Ins-Stop contenant le site de restriction pour l'enzyme *HindIII* (nucléotides soulignés AAGCTT) :

Amorce 342-356Ins-A : 5' CGGAATGCCAAGCTTTTTTCATCACCGT 3'

Amorce 342-356Ins-Stop: 5' CGGAATGCCAAGCTTCTATTTTTCATCACCGT 3'

Amorce CMVpromF : 5' AGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTA 3'

Les amorces contiennent soit l'insertion d'un T ou des nucléotides CTA (en rouge) par rapport à la séquence matrice. Le fragment PCR est digéré par *NdeI* + *HindIII* et inséré dans les mêmes sites dans pCMV3-luc. Les plasmides sont extraits, puis séquencés avant d'être amplifiés.

1.1.c. Culture cellulaire et transfection transitoire.

Vingt-quatre heures avant la transfection, les cellules HeLa sont réparties à raison de $4 \cdot 10^4$ cellules par puits. Les plasmides codant la luciférase de *photinus pyralis* sont co-transfectés avec un vecteur de référence : phRL-SV40 (Promega, Madison, WI) contenant le gène de la luciférase de *Renilla reniformis* en aval du promoteur SV40 (chapitre 1, II). La mesure de l'activité de ces gènes rapporteurs est réalisée 48 heures après la transfection des cellules.

La co-transfection de phRL-SV40 permet de minimaliser la variabilité introduite par la transfection. En effet, pour comparer l'initiation de traduction des différents vecteurs, il

faut s'assurer que l'efficacité de transfection est comparable dans les diverses expériences. L'activité luciférase de *Renilla photinus pyralis* introduite par le vecteur phRL-SV40 servira de contrôle interne d'efficacité de transfection et de reproductibilité.

1.1.d. Mesure de l'activité luciférase.

L'efficacité de traduction de chacun des vecteurs étudiés est estimée par le rapport de l'activité luciférase *photinus pyralis* sur l'activité luciférase de *Renilla photinus pyralis*. La co-transfection est réalisée en triplicatas, la moyenne des 3 mesures obtenues pour chaque activité et pour chaque plasmide est calculée.

La lyse des cellules et la mesure de l'activité des deux luciférases sont réalisées avec le kit Dual-Luciférase Reporter Assay System (Promega, Madison, WI) selon les recommandations du fabricant. La méthode de mesure est basée sur le fait que les substrats des deux luciférases sont différents. L'activité luciférase de *photinus pyralis* est d'abord mesurée. La solution de luciférine est injecté dans chaque tube Röhren (Starstedt, Numbrecht, Allemagne) lors du passage dans le luminomètre Berthold Lumat 9501 (Berthold EG&G, Badwildbad, Allemagne). Après cette mesure la luciférase de *photinus pyralis* est inhibée et la luciférase de *Renilla reniformis* est activée (après ajout de coelenterazine) et mesurée. L'activité luciférase est exprimée en RLU (Relative Light Units).

1.2. Résultat.

L'histogramme (figure 60) représente le rapport des activités luciférase de *photinus pyralis* sur l'activité luciférase de *Renilla reniformis* pour les différentes constructions.

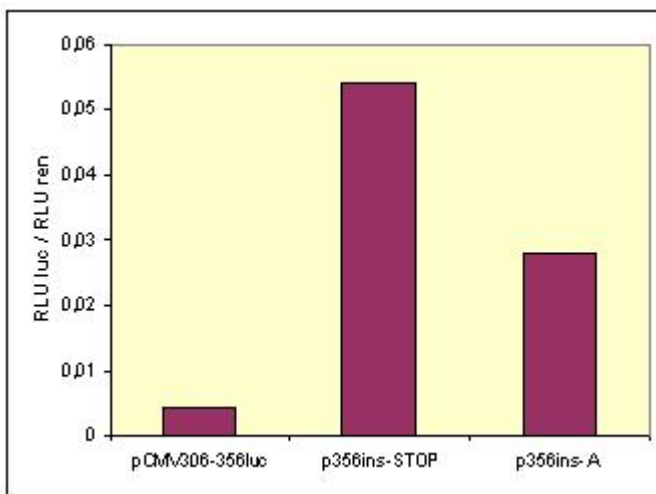


Figure 60 : Initiation de traduction de la cytogaligine à partir des AUG_{321_323} ou AUG_{348_350}.

pCMV306-356luc : vecteur contenant les séquences 306 à 356 de l'intron 2. p356ins-STOP : vecteur modifié, insertion en position 354, 355, 356 du triplet UAG introduisant un codon STOP. p356ins-A : vecteur modifié, insertion en 356 d'un A, mise en phase des ORF.

Comme attendu, le vecteur pCMV306-356luc présente une activité luciférase très faible. Il est possible que la mobilisation du ribosome depuis les AUG_{321_323} ou AUG_{348_350} le rende indisponible pour initier la traduction au niveau de l'AUG_{luciférase} (figure 60).

L'insertion d'un codon STOP (figure 59) en amont de l'ATG_{luciférase} provoque une forte augmentation de l'activité luciférase. Ainsi, on peut penser que ce codon STOP permet de libérer le ribosome, et de le rendre disponible pour ré-initier une traduction sur l'AUG_{luc} localisé en aval. Cette "stratégie" est fréquemment observée dans les gènes eucaryotes, une ORF courte est présente en amont d'une ORF longue. Ces séquences ont pour rôle d'augmenter le niveau de traduction (Meijer et Thomas, 2002).

De même, du fait de l'insertion d'un A en position 356 (p356-insA), les ORFI et ORFII se retrouvent en phase avec l'ORF de la luciférase (figure 58). Le ribosome peut donc théoriquement initier la traduction sur l'ATG₃₂₁₋₃₂₃ ou l'ATG₃₄₈₋₃₅₀, pour produire des luciférases chimères ou sur l'ATG_{luc}, pour produire une luciférase normale. L'activité luciférase observée est sensiblement augmentée, ce qui montre que les ATG₃₂₁₋₃₂₃ ou ATG₃₄₈₋₃₅₀ peuvent effectivement être utilisés pour initier de la traduction.

1.3. Conclusion.

Les résultats observés montrent que la séquence 306-356 de l'intron 2, séquence que l'on retrouve dans le petit l'ARNm de *galig*, contient deux codons AUG, et que l'un ou l'autre peut être utilisé pour initier de la traduction. Ces deux codons AUG se retrouvent dans un contexte Kozak faible, il reste à établir lequel de ces deux ATG est réellement utilisé. L'initiation de la traduction de la cytogaligine apparaît complexe. Il semble que plusieurs sites d'initiation de traduction, localisés dans l'intron 2 ou dans l'exon 3, soient utilisables. Par ailleurs, il convient de rappeler que la délétion totale de l'intron 2 n'empêche pas l'initiation de traduction de la cytogaligine dans l'exon 3. Ceci laisse supposer que l'initiation de traduction de la cytogaligine est soumise au phénomène de leaky scanning.

CHAPITRE 5 : Détection des ARNm de *galig* par RT-PCR quantitative.

Afin de pouvoir étudier l'expression de *galig* dans différentes lignées cellulaires et *in vivo* dans des tissus humains, nous avons voulu mettre au point une technique de détection des ARNm par RT-PCR quantitative en temps réel. Il faut rappeler que *galig* peut produire deux formes différentes d'ARNm. En effet, des premiers résultats ont montré que certains tissus comme le cœur et le muscle, présentaient ces deux formes (longue et courte) de l'ARNm de *galig* (Guittaut *et al.*, 2001) (figure 30). Il était donc indispensable de pouvoir amplifier spécifiquement ces deux transcrits.

I. Principe.

La PCR quantitative "TaqMan" permet d'obtenir un signal fluorescent à partir d'une sonde bi-marquée (figure 61). L'augmentation de la fluorescence est proportionnelle au produit de PCR synthétisé. La sonde est un oligonucléotide spécifique d'un fragment interne à la séquence amplifiée et marquée en 5' par un fluorophore appelé "reporter" et en 3' par un autre type de fluorophore appelé "quencher". Le spectre d'émission du reporter chevauche le spectre d'excitation du quencher. L'émission du reporter est atténuée ou "quenchée" (éteint) par la proximité du quencher. Durant l'étape d'élongation par la DNA polymérase, la sonde sera dégradée par l'activité exonucléase de la Taq, les fluorophores ne seront plus reliés entre eux et l'émission du reporter sera augmentée. L'augmentation du signal correspondant à la composante du fluorophore reporter est proportionnelle au nombre de copies polymérisées à chaque cycle de la PCR.

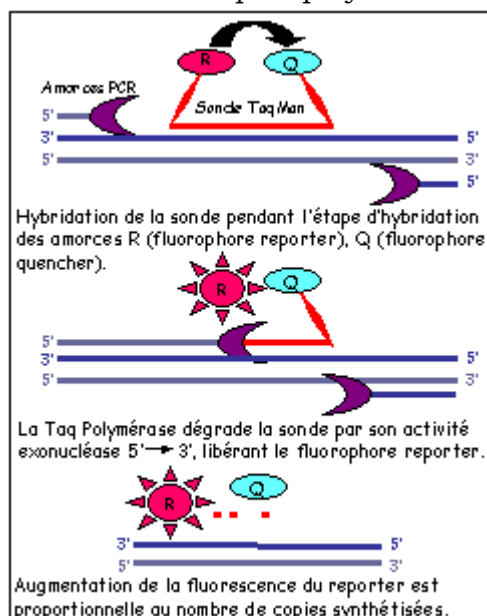


Figure 61 : Principe de la PCR-quantitative.

II. Quantification des ARNm de *galig*.

1. Matériel et méthodes.

1.1. Contrôle des amorces

Nous avons choisi d'amplifier et de quantifier des fragments d'ARNm issus de la transcription des gènes de la *galectine-3* et *galig*. Pour la quantification des ARNm, la sonde TaqMan a été choisie commune aux ARNm du gène de la *galectine-3* et des formes longues et courtes de *galig*. Cette sonde, HP-GLG01, s'hybride dans l'exon 3 (figure 62). La discrimination entre les différentes formes d'ARNm amplifiées est réalisée par les amorces PCR répertoriées dans le tableau 7. Le contrôle interne de l'expérience est constitué par la quantification d'un fragment d'ARNm d'un gène pris comme référence : le gène GAPDH (glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase humaine). Le nombre de copies obtenues pour *galig* et la *galectine-3*, sera rapporté au nombre de copies obtenues pour GAPDH.

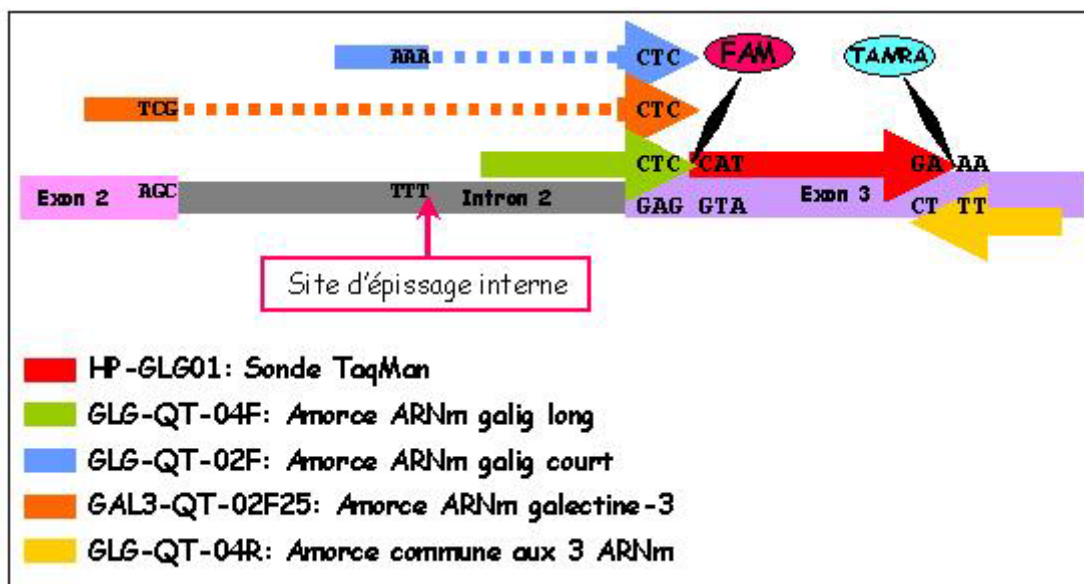


Figure 62 : Représentation schématique de l'hybridation spécifique des amorces sur la séquence du gène de la *galectine-3*.

L'amorce bleue GLG-QT-02F ne peut s'hybrider que sur la forme mature de l'ARNm court de *galig*. L'amorce verte ne peut s'hybrider que sur la forme longue de l'ARNm de *galig*. L'amorce orange ne peut s'hybrider que sur la forme mature de l'ARNm de la *galectine-3*. Ces trois amorces s'hybrident sur les trois dernières bases (extrémité 3') avec les trois premières bases de l'exon 3 du gène *LGALS3*.

La spécificité des amorces (présentées tableau 7) a été vérifiée par PCR sur les ADNc de chaque gène (résultat non montré). Nous nous sommes assurés, en particulier, que le couple d'amorces GLG-QT-02F et GLG-QT-04R ne produisent pas de fragments PCR avec les plasmides pHG3 et pgalig.

Tableau 7 : Couples d'amorces et conditions PCR utilisées pour l'amplification et la quantification des ARNm des formes longue et courte de *galig*, de la *galectine-3* et de *GAPDH*.

Nom du plasmide	Amorces	Séquences des amorces	T _m
p <i>galig</i> (ADNc <i>galig</i> forme longue)	GLG-QT-04F	5' GTGTATGTCTTTCTTTCCAGCTC 3'	57,2°C
	GLG-QT-04R	5' ATCCTTGAGGGTTTGGGTT 3'	58,3°C
pHi446A (ADNc <i>galig</i> forme courte)	GLG-QT-02F	5' TTCTCACGGTGATGAAAACTC 3'	59,2°C
	GLG-QT-04R	5' ATCCTTGAGGGTTTGGGTT 3'	58,3°C
pHG3 (ADNc <i>galectine-3</i>)	GAL3-QT-02F	5' GGCAGACAATTTTTCGCTC 3'	58,4°C
	GLG-QT-04R	5' ATCCTTGAGGGTTTGGGTT 3'	58,3°C
—	HP-GLG01 (sonde TaqMan)	FAM5' CATGATGCGTTATCTGGGTCTGGA3' TAMRA	67,3°C
pGAPDH	GAPDH3 GAPDH2	5' CATCAATGGAAATCCCATCAC 3' 3' AGAAGGCTGGGGCTCATTT 5'	
—	HP-GAPDH (sonde TaqMan)	FAM5' CATCTTCCAGGAGCGAGATCCCTC3' TAMRA	69°C

1.2. PCR

Le milieu réactionnel (25 µl) contient :

- L'ADNc
- 0,3 µM de chacune des amorces
- 0,1 µM de sonde TaqMan
- 12,5 µl 2x QuantiTect Probe Master Mix (Tris Cl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 8 Mm MgCl₂, pH 8,7 + dNTP + HotStarTaq DNA Polymérase)

Les amorces utilisées (MWG Biotech AG, Ebersberg, Allemagne) sont présentées dans le tableau 7. La réaction PCR est réalisée dans un appareil à cycles thermiques programmables (SmartCycler®, Cepheid, USA) et se déroule comme suit :

Quinze minutes de dénaturation préalable à 95°C suivie de 45 cycles d'amplification composés de :

- 45 secondes de dénaturation à 95°C
- 45 secondes d'hybridation à 59°C
- 45 secondes d'extension des amorces à 72°C.

Les études antérieures ont permis de dégager des spécificités dans l'expression du gène *galig*. Les résultats obtenus ont révélé :

- Que le promoteur du gène *galig* n'est pas constitutif et que son expression est régulée différemment selon les tissus.
- Que l'expression du gène *galig* est indépendante de celle du gène de la *galectine-3* puisqu'il existe des tissus dans lesquels seul l'un ou l'autre des transcrits est exprimé.
- Que la transcription du gène *galig* semble dépendante de la différenciation cellulaire.

Nous avons étudié l'expression du gène *galig* dans une lignée de cellule sanguine humaine tumorale, la lignée monocyttaire de cellules THP-1, cultivées en présence ou en absence de PMA : phorbol 12-myristate 13-acétate. Ce traitement induit la différenciation des lignées humaines de cellules lymphoïdes en culture, vers des cellules de type macrophage. Il est connu que le gène de la galectine-3 est activé dans ces conditions. Cette expérience nous servira de référence pour valider le test expérimental.

2. Résultat.

2.1. Calibration.

Nous avons validé notre système en comparant le gène de la *galectine-3*, dont l'expression est augmentée lors de la différenciation en macrophage, avec les formes longues et courtes de *galig*. Le contrôle interne est effectué avec le gène *GAPDH* dont l'expression est constitutive. La calibration est effectuée en réalisant des RT-PCR quantitatives sur une gamme de dilution de chacun des plasmides contenant les ADNc de la *galectine-3*, de *GAPDH* ou des formes longues et courtes de *galig*. Il est tracé le Ct (Threshold Cycle) en fonction du \log_{10} du nombre de copies. Le Ct représente un nombre de cycle correspondant au seuil où le signal de fluorescence émerge du bruit de fond.

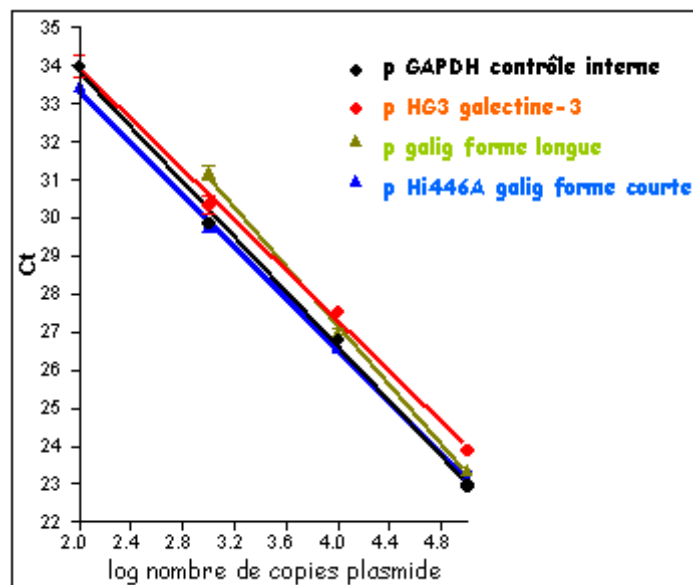


Figure 63 : Courbes d'étalonnages obtenues pour chaque plasmide.

Les droites étalons permettent de déterminer les coefficients directeurs (a) et les ordonnées à l'origine (b). Les équations de droite pour chaque plasmide sont calculées et reportées dans le tableau 8.

Tableau 8 : Equations des droites d'étalonnages de chaque plasmide.

Nom du plasmide	Ct=aX+b
p <i>galig</i>	-3,898X+42,75
pHi-446A	-3,41X+40,15
pHG3	-3,311X+40,53
pGAPDH	-3,608X+41,04

Pour déterminer la quantité d'ADNc d'un échantillon, il suffit de reporter le Ct expérimental dans ces équations.

2.2. bExpression de *galig* après incubation des THP1 avec le PMA.

A partir des données de la RT-PCR quantitative et par référence aux courbes d'étalonnages obtenues pour chaque gène, nous pouvons calculer le nombre de molécules d'ADNc par échantillon et le rapporter à la quantité d'ADNc du gène de référence GAPDH pour ce même échantillon. Ainsi, il est possible d'estimer la variation d'expression de chacun des gènes au cours de la différenciation cellulaire. Les résultats sont présentés dans les tableaux ci-dessous.

Tableau 9 : Quantification de l'ARNm *GAPDH* après traitement au PMA de cellules THP1.

	- PMA		+ PMA	
	Ct	Nbre molécules	Ct	Nbre molécules
<i>GAPDH</i>				
Qtité ARN (ng)				
1	26,71	9370	27,34	6268
10	23,23	86348	23,66	65626
100	19,754	793720	19,98	687114
300	18,095	2288745	18,224	2107033
500	17,323	3745008	17,408	3547703

Tableau 10 : Quantification de l'ARNm de *galectine-3* après traitement au PMA de cellules THP1.

<i>Galectine-3</i>		- PMA		+ PMA		Amplification	
Qtité ARN (ng)	Ct	Nb molécules	1 <i>gal3l/GAPDH</i>	Ct	Nb molécules	2 <i>gal3l/GAPDH</i>	2/1
1	33,5	182	$19,42 \cdot 10^{-3}$	30,14	2192	$349,71 \cdot 10^{-3}$	18
10	30,207	2086	$24,16 \cdot 10^{-3}$	26,665	28721	$437,65 \cdot 10^{-3}$	18,1
100	26,914	23886	$30,09 \cdot 10^{-3}$	23,19	376325	$547,69 \cdot 10^{-3}$	18,2
							Moy 18.1

Tableau 11: Quantification de la forme longue de l'ARNm de *galig* après traitement au PMA de cellules THP1.

<i>Galig long</i>		- PMA		+ PMA		Amplification	
Qtité ARN (ng)	Ct	Nb molécules	1 <i>galig L/GAPDH</i>	Ct	Nb molécules	2 <i>galig L/GAPDH</i>	2/1
1	36,02	53	$5,66 \cdot 10^{-3}$	36,22	47	$7,5 \cdot 10^{-3}$	1,3
10	32,465	435	$5,04 \cdot 10^{-3}$	32,77	363	$5,53 \cdot 10^{-3}$	1,1
100	28,91	3553	$4,48 \cdot 10^{-3}$	29,32	2788	$4,06 \cdot 10^{-3}$	0,9
							Moy 1,1

Tableau 12: Quantification de la forme courte de l'ARNm de *galig* après traitement au PMA de cellules THP1.

<i>Galig court</i>		- PMA		+ PMA		Amplification	
Qtité ARN (ng)	Ct	Nb molécules	1& <i>galig C/GAPDH</i>	Ct	Nb molecules	2 <i>galig C/GAPDH</i>	2/1
100	37,772	5	$6,29 \cdot 10^{-6}$	35,2	28	$4,07 \cdot 10^{-5}$	6,5
300	36,048	16	$6,29 \cdot 10^{-6}$	33,673	79	$3,74 \cdot 10^{-5}$	6
500	35,246	27	$7,2 \cdot 10^{-6}$	32,963	128	$3,6 \cdot 10^{-5}$	5,0
							Moy 5,8

Ces tableaux présentent le nombre de molécules d'ADNc dans chaque échantillon. Cette quantité est proportionnelle à la quantité d'ARNm. Le facteur d'amplification représente le rapport du nombre de molécules d'ARNm des gènes étudiés dans les cellules traitées au PMA par rapport aux cellules non traitées. Le calcul de ce taux d'amplification nous permet de constater qu'il reste constant quelle que soit la quantité de matrice utilisée, ce qui nous permet de valider la technique de quantification. Ces données sont exploitées et représentées dans le graphe ci-dessous (figure 64).

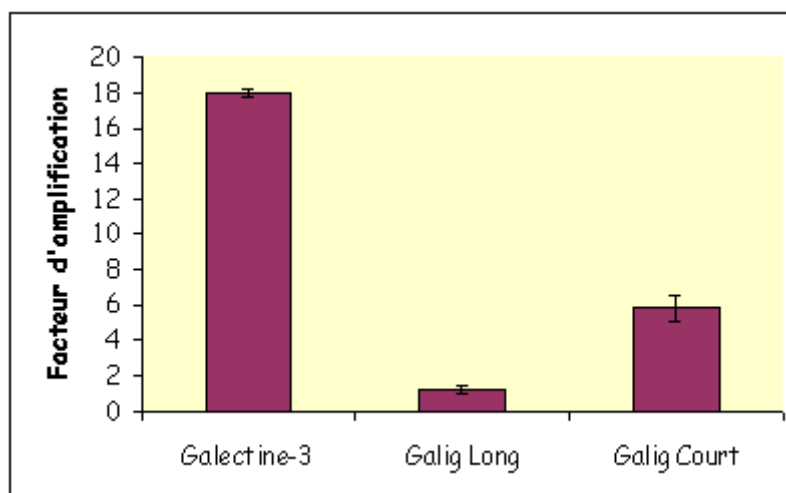


Figure 64 : Effets du PMA dans les cellules THP1 sur l'expression des ARNm de *LGALS3* et des formes longues et courtes de *galig*.

L'histogramme de la figure 64, fait apparaître, comme attendu, que le gène de la *galectine-3* est fortement sur-exprimé lors de la différenciation des monocytes en macrophages. La forme longue du transcrit de *galig* ne présente pas de variation de son taux de transcription durant l'activation des cellules THP1 au PMA. A l'inverse, la forme courte du transcrit de *galig*, moins exprimée que la forme longue du transcrit de *galig*, montre un facteur d'amplification d'environ 6 fois.

La technique de RT-PCR quantitative s'est avérée adaptée à la quantification des ARNm de *galig*. Les résultats présentés montrent qu'en plus de cet aspect quantitatif, nous avons pu discriminer entre les deux formes longues et courtes de *galig*. L'utilisation de la RT-PCR quantitative en temps réel apparaît par conséquent comme un bon outil pour l'étude de l'expression du gène *in vivo*.

**DISCUSSION, CONCLUSION et
PERSPECTIVES**

I. *Galig* et mort cellulaire.

1. Effet de l'expression de *galig* sur la morphologie cellulaire.

La cytotoxicité induite par les vecteurs d'expression de *galig* est mise en évidence par de profondes altérations morphologiques. Les cellules HeLa, transfectées avec des vecteurs codant la mitogaligine-EGFP et la cytogaligine puis, analysées en microscopie de fluorescence, présentent les caractéristiques morphologiques typiques de cellules mortes. Les cellules apparaissent rétractées, arrondies, condensées et se détachent de la surface de la boîte de culture (article figure 2). Les organites se condensent et forment des corps vésiculaires qui finissent par s'agréger au stade terminal du processus de mort. En microscopie de fluorescence, les mitochondries des cellules transfectées apparaissent également agrégées.

Ces observations ont été confirmées par une étude en cytométrie en flux. Les cellules transfectées montrent une proportion beaucoup plus importante de cellules présentant des altérations morphologiques sévères. Cela se traduit par une modification significative des paramètres FSC/SSC, utilisés comme index de la taille et de la granulosité des cellules (article figure 3). L'expression de *galig* a pour conséquence, une accumulation de cellules mortes et de débris (baisse du FSC et augmentation du SSC). Le paramètre SSC reflète l'augmentation de la granulosité intracellulaire des cellules produisant les galigines, et traduit donc une vésicularisation du cytoplasme. L'agrégation des organites peut également être mise en évidence au cours d'expériences de micro-injection cellulaire. La micro-injection cytoplasmique du peptide MG-[35-53] de la mitogaligine induit un changement rapide de la structure interne des cellules. Les organites s'agrègent immédiatement et la cellule se rétracte (article figure 9). Cette expérience tend à montrer que la participation de la mitogaligine est déterminante dans le processus de mort. Elle pourrait constituer un élément "moteur" dans la condensation cellulaire et la vésicularisation des endomembranes.

Des expériences de transfection cellulaire du gène *galig* montrent que la membrane plasmique conserve son intégrité jusqu'à un stade avancé du processus de mort. La co-transfection d'un vecteur d'expression de *galig* et d'un vecteur codant EGFP, ne montre pas de fuite extra-cellulaire de fluorescence dans les cellules transfectées (figure 35). S'il y a formation de pores dans la membrane plasmique, leur taille n'est pas suffisante pour laisser la protéine EGFP diffuser vers le milieu extracellulaire. De même, l'incubation des cellules avec du bleu trypan confirme que les membranes ne sont pas perméabilisées car ce colorant ne pénètre pas dans les cellules transfectées (résultat non montré). Ces observations suggèrent que la mort cellulaire induite par l'expression de

galig ne correspond pas à un phénomène de nécrose puisque la rupture de la membrane plasmique n'a pas été observée.

Ainsi, il apparaît que le gène *galig* est toxique et peut induire la mort cellulaire. Son expression dans les cellules conduit à l'agrégation des organites cellulaires sans altérer la membrane plasmique. Ces résultats permettent d'envisager le déclenchement d'un phénomène d'apoptose dans les cellules exprimant *galig*.

2. Le rôle de la mitochondrie dans la mort cellulaire induite par *galig*.

L'expression de *galig* dans les cellules a permis de rendre compte d'une modification de la distribution des mitochondries. La fluorescence, associée à l'expression de la mitogaligine, localisée à la mitochondrie, révèle une forte agrégation et une forte condensation de ces organites qui, par ailleurs, se retrouvent localisées en périphérie du noyau. Les effets directs de peptides synthétiques dérivés de la mitogaligine sont analysés au laboratoire par Patrick Gonzalez. Le peptide MG[35-53] de la mitogaligine a été incubé avec des mitochondries. Ceci a permis de constater la formation immédiate d'agrégats de mitochondries isolées. Les résultats de ces expériences réalisées *in vitro* viennent conforter les observations faites sur les cellules exprimant les galigines.

Durant l'apoptose, l'agrégation mitochondriale peut s'accompagner de la libération de facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux comme le cytochrome *c* (Haga *et al.*, 2003). C'est pourquoi, il semblait intéressant de déterminer si l'expression de *galig* pouvait également conduire au relargage extra-mitochondriale du cytochrome *c*. Les résultats obtenus indiquent qu'effectivement la production des galigines induit le relargage du cytochrome *c* depuis la mitochondrie vers le cytosol, ce qui traduit la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie (article figure 7).

2.1. Activation des caspases.

Le cytochrome *c* une fois libéré de la mitochondrie participe à la formation de l'apoptosome. Cependant, cette relocalisation du cytochrome *c* dans le cytosol ne garantit pas le déclenchement de l'apoptose (Deshmukh et Johnson, 1998; Li *et al.*, 2005). Deux techniques ont été utilisées afin de déterminer si la délocalisation du cytochrome *c* était effectivement à l'origine de l'activation de la caspase-3. La première, basée sur la coupure d'un substrat fluorescent de la caspase-3 (test PhiPhilux) (Packard *et al.*, 1996), indique que les cellules exprimant *galig* ne présentent pas d'activation de cette protéase (figure 39). La seconde technique repose sur la détection du fragment de PARP clivé, une enzyme nucléaire substrat de la caspase-3. De nouveau, aucune activation de la

caspase-3 peut être mise en évidence (figure 37). Il faut noter que la PARP est également un substrat pour la caspase-7

Un autre argument vient étayer ces conclusions. Les cellules MCF-7 transfectées par *galig* meurent en présentant les mêmes caractéristiques morphologiques que les cellules Hos ou HeLa. Or, les cellules MCF-7 sont dépourvues de caspase-3 fonctionnelle car elles présentent une délétion de 47 pb dans un exon du gène de la caspase-3. (Janicke *et al.*, 1998). Ces résultats renforcent donc les observations précédentes et laissent penser que le mécanisme de mort cellulaire induit par le gène *galig* est effectivement indépendant de la caspase-3. Nous envisageons de tester un inhibiteur à large spectre des caspases (zVAD-fmk) afin de déterminer si le processus de mort est dépendant ou indépendant de l'activation d'autres caspases.

2.2. Potentiel membranaire mitochondrial.

La déstabilisation des membranes mitochondriales et la dissipation du potentiel transmembranaire ($\Delta\Psi_m$) sont des étapes clés dans les processus de MCP empruntant la voie mitochondriale (Waterhouse *et al.*, 2002 ; Zamzami *et al.*, 1995). Jusqu'à maintenant, nous n'avons pas trouvé de marqueur permettant la mise en évidence de perturbations du $\Delta\Psi_m$ lors d'expériences de transfection transitoire. L'utilisation de la transfection transitoire comme système d'étude rend les expériences délicates à réaliser et à interpréter dans la mesure où, les cellules non transfectées perturbent les observations et les analyses. Nous ne sommes pas parvenus à conclure définitivement sur une éventuelle perturbation du $\Delta\Psi_m$ lors de l'expression de *galig*. La seule donnée dont nous disposons provient de l'observation de cellules MCF-7 transfectées par *galig* et dont les mitochondries ont été marquées spécifiquement au MTR. L'analyse des cellules exprimant *galig*, montre qu'elles présentent une fluorescence rouge moins soutenue que les cellules non transfectées (résultat non montré). Cette particularité pourrait rendre compte d'une dissipation du $\Delta\Psi_m$ souvent corrélée à la mise en route des programmes de mort puis à la perméabilisation de la membrane mitochondriale (Gilmore et Wilson, 1999). Cependant, l'utilisation du MTR pour rendre compte de cette dépolarisation des membranes mitochondriales est controversée (Buckman *et al.*, 2001).

Afin d'évaluer le dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, il sera intéressant de mesurer le niveau d'ATP dans la cellule (Crouch, 2000; Pham *et al.*, 2000). Cette donnée permettra de déterminer si le mécanisme de mort induit par *galig* nécessite de l'énergie cellulaire comme l'apoptose ou si, à l'inverse, il s'en affranchit.

3. *Galig* et marqueurs de l'apoptose.

Il est admis que la MCP peut être initiée dans un contexte différent de l'activation des caspases (Benson *et al.*, 1998; Deshmukh *et al.*, 2000; Okuno *et al.*, 1998 ; Xiang *et al.*, 1996). L'absence d'activation de la caspase-3 suggère que la mort cellulaire induite par *galig* puisse emprunter une voie différente de l'apoptose. Par conséquent d'autres marqueurs d'apoptose ont été testés.

3.1. Marquage à l'annexine V.

Les cellules transfectées par *galig* présentent un marquage positif à l'annexine V lors de leur observation en microscopie de fluorescence (article figure 4, B). Ceci révèle l'externalisation de la phosphatidylsérine au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique. La modification topologique de ce phospholipide membranaire est un événement précoce des programmes de mort cellulaire par apoptose (Martin *et al.*, 1995). En ce sens, la mort induite par *galig* présente une caractéristique des cellules apoptotiques, à savoir une réorganisation de la membrane plasmique. Il convient cependant de noter que ce marquage à l'annexine V ne concerne que des cellules extrêmement condensées et arrondies. Les quelques cellules encore étalées, c'est à dire se trouvant avant ou bien au début du processus de mort, ne sont jamais marquées à l'annexine V (résultat non montré). La perte d'asymétrie de la membrane plasmique des cellules exprimant *galig* ne semble pas être un phénomène précoce.

3.2. Marquage Hoechst 33342.

L'expression de *galig* provoque également des modifications morphologiques nucléaires visibles par coloration au Hoechst 33342. Ce colorant nous permet d'observer dans les cellules transfectées l'état très condensé de la chromatine (article figure 4A). Cette condensation des acides nucléiques n'est observable que lorsque la morphologie générale de la cellule est déjà très altérée.

3.3. Test TUNEL.

Les cellules HeLa exprimant la mitogaligine-DsRED2 et la cytogaligine sont toujours négatives pour le marquage par la technique TUNEL (figure 36 b). Ce résultat montre que l'expression de *galig* n'induit pas l'activation d'endonucléases responsables d'un clivage de l'ADN générant des extrémités 3'OH libres, et n'induit donc pas la fragmentation inter-nucléosomique de l'ADN.

Ces expériences confortent l'idée que la MCP initiée par *galig* présente des caractéristiques différentes de celles que l'on attendrait pour l'apoptose, en particulier une absence d'activation de la caspase-3 et de dégradation inter-nucléosomique de l'ADN. Si le marquage à l'annexine V et la condensation de la chromatine sont mis en évidence, ces marqueurs n'apparaissent que lors des stades tardifs du processus de mort.

Afin de caractériser la voie moléculaire induite par *galig*, il semble nécessaire de rechercher si d'autres acteurs moléculaires que le cytochrome c interviennent dans ce processus de mort. On peut poser la question de savoir si, à l'image de l'apoptose induite par Bax, des protéines telles Smac/DIABLO, l'Endo G, Omi/Htr A2 et l'AIF sont libérées de l'espace inter-mitochondrial et contribuent à l'activation du programme de mort dépendant de *galig* ? Il a été établi lors de la MCP induite par Bax, qu'en présence de zVAD-fmk, le relargage de cytochrome c et de Smac/DIABLO était toujours observé mais plus celui de l'AIF (Arnoult *et al.*, 2003). La libération cytosolique de l'AIF semble donc nécessiter l'activation des caspases, cependant que son implication dans la dégradation en gros fragments de l'ADN est indépendante des caspases. Il serait intéressant d'établir si *galig* peut intervenir dans le processus de libération cytosolique de l'AIF ou d'autres facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux.

3.4. Inhibition de la mort cellulaire induite par *galig*.

3.4.a. La protéine anti-apoptotique Bcl-X_L inhibe la libération de cytochrome c induite par *galig*.

Etant donné que les protéines de la famille Bcl-2 sont des régulateurs des voies de MCP, nous avons recherché si les membres anti-apoptotiques pouvaient influencer sur la mort cellulaire induite par *galig*. Des expériences de co-transfection ont permis de révéler la co-localisation de la mitogaligine et de Bcl-X_L (figure 43). Les cellules co-exprimant *galig* et Bcl-X_L présentent une morphologie générale tout à fait différente des cellules exprimant *galig* seul. La majorité des cellules transfectées ne présentent pas les caractéristiques typiques des cellules mortes, elles sont beaucoup moins arrondies et/ou condensées. Ce résultat suggère que la protéine anti-apoptotique Bcl-X_L puisse prévenir, au moins partiellement, les propriétés cytotoxiques de *galig*. Cet effet protecteur de Bcl-X_L est également mis en évidence par une diminution de la fuite de cytochrome c cytosolique. Les deux protéines étant co-localisées à la membrane mitochondriale, cette protection pourrait être conférée par Bcl-X_L en limitant l'effet déstabilisateur de la mitogaligine sur les membranes mitochondriales. En revanche ce même effet protecteur

n'a pas été mis en évidence pour la protéine anti-apoptotique Bcl-2 tant sur le point de la morphologie des cellules que sur la libération de cytochrome c.

Le rôle protecteur de Bcl-X_L sur les protéines pro-apoptotique est connu. Par exemple, Bcl-X_L inhibe la mort induite par Bax, en empêchant la libération de cytochrome c et donc l'activation des caspases (Finucane *et al.*, 1999 ; Kluck *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1997). Le rôle de Bcl-X_L serait d'empêcher l'oligomérisation de Bax au niveau de la membrane externe de la mitochondrie et d'inhiber la translocation du cytochrome c des mitochondries vers le cytosol (Wolter *et al.*, 1997). En effet, l'oligomérisation de Bax semble être un événement nécessaire pour perméabiliser la membrane externe de la mitochondrie puisque sous forme de monomères, Bax, s'avère incapable d'induire la libération des facteurs de mort (Gross *et al.*, 1998). Des analyses spectrales par RMN et par diffraction aux rayons X de Bcl-X_L, en absence de son domaine transmembranaire, ont permis de déterminer que sa structure tri-dimensionnelle comporte sept hélices. Les domaines BH-1, BH-2 et BH-3 forment une poche hydrophobe dans laquelle viennent s'insérer des partenaires de mort (Muchmore *et al.*, 1996). Ainsi, il a été établi que l'hélice $\alpha 9$ correspondant au domaine transmembranaire de la protéine Bax vient se loger dans la poche hydrophobe de Bcl-X_L (Suzuki *et al.*, 2000). La formation de ce complexe empêche Bax d'être transloqué à la mitochondrie et de s'oligomériser.

L'inhibition par une protéine anti-apoptotique d'une voie de mort cellulaire non apoptotique n'est plus une donnée surprenante. En effet, si les protéines de la famille Bcl-2 ont été initialement décrites comme régulatrices de l'apoptose, elle participe également à la régulation de voies de MCP non apoptotique et caspase-indépendante. Par exemple, il a été décrit le rôle inducteur de la protéine HSpin1 dans une voie de mort cellulaire ne présentant pas les caractéristiques typiques de l'apoptose (Yanagisawa *et al.*, 2003). Cette voie est indépendante de l'activation des caspases, et n'induit pas le relargage du cytochrome c depuis la mitochondrie vers le cytoplasme. Comme cela a pu être observé pour *galig*, la mort cellulaire induite par HSpin1 est inhibée par Bcl-X_L, et les deux protéines sont partiellement co-localisées à la membrane mitochondriale puisque HSpin1 est à la fois distribuée à la mitochondrie et dans le cytoplasme. Il a été démontré que cette co-localisation était due à une interaction physique entre Bcl-X_L et HSpin1, ainsi HSpin1 inhiberait l'activité anti-apoptotique de Bcl-X_L.

L'apoptose peut occasionner un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire de la mitochondrie, qui peut être responsable d'une augmentation significative de la production de ROS, à l'origine d'effets délétères sur les constituants cellulaires (Xiang *et al.*, 1996). Ainsi, il a été montré que la translocation cytosolique du cytochrome c est associée à une interruption dans le transfert des électrons le long de la chaîne respiratoire et précède le signal oxydant et l'apparition des ROS (Cai et Jones, 1998). Le

rôle des ROS durant l'apoptose a été proposé lorsqu'il a été observé que la protéine anti-apoptotique Bcl-2 présentait des fonctions anti-oxydantes (Kane *et al.*, 1993).

Une étude rapporte que la protéine Bax provoque un stress oxydant provoquant l'oxydation des lipides de la mitochondries, et que la co-expression de Bax avec la protéine Bcl-X_L prévient cette lipoperoxydation et la mort cellulaire (Priault *et al.*, 2002).

Ainsi, il est envisagé d'étudier si la cytotoxicité induite par *galig* s'accompagne ou ne s'accompagne pas de la production de ROS.

3.4.b. *Galig* et *galectine-3*.

Le locus *LGALS3* contient deux gènes présentant des fonctions opposées. Le gène de la *galectine-3* présente une fonction anti-apoptotique et *galig* induit la mort cellulaire.

L'effet de la co-expression de la *galectine-3* et de *galig* a été étudié afin de déterminer si, à l'image de la protéine Bcl-X_L qui protège la mitochondrie de l'activité de Bax, la *galectine-3* pouvait exercer un effet protecteur lors de l'expression de *galig*.

Les expériences de co-transfection indiquent l'absence d'un tel effet protecteur tant d'un point de vue de la morphologie des cellules, que de la libération de cytochrome *c*. Ces résultats suggèrent que l'expression de la *galectine-3* ne protège pas la membrane mitochondriale de la perméabilisation induite par l'expression de *galig*. Dans la mesure où il a été montré que la *galectine-3* était transloquée à la membrane mitochondriale lors de l'apoptose et que cette re-localisation inhibait le relargage extra-mitochondrial du cytochrome *c*, on aurait pu s'attendre à observer le contraire. Par conséquent, nos résultats indiquent que ces gènes présentent des fonctions opposées qui ne sont pas interconnectées.

Une autre série d'expérience, non présentée dans ce manuscrit, va dans le sens de ces observations. Un test de prolifération cellulaire, basé sur la mesure de l'activité totale des déshydrogénases cellulaires, a été effectué sur des cellules HeLa co-transfectées par *galig* et *LGALS3*. Les courbes de croissances obtenues ont montré un effet cytotatique des cellules co-exprimant *galig* et la *galectine-3*. Par conséquent, cette co-transfection ne montre pas d'effet protecteur de la *galectine-3* sur la prolifération des cellules exprimant les galigines.

II. Implication de la mitogaligine dans la mort cellulaire induite par *galig*.

L'altération du réseau mitochondrial, consécutive à l'expression de *galig*, ainsi que la localisation de la mitogaligine impliquent de déterminer si l'effet cytotoxique observé est imputable à l'action directe de la mitogaligine sur les mitochondries.

1. Localisation intracellulaire de la mitogaligine.

La séquence permettant le ciblage de la mitogaligine vers la mitochondrie a été recherchée. Des vecteurs d'expression produisant des formes tronquées de la mitogaligine fusionnées à EGFP ont été construits et testés par transfection. L'observation des cellules a montré que le signal mitochondrial était localisé dans la partie centrale de la protéine entre les acides aminés 31 et 54 (article, figure 8). A la différence de la plupart des signaux de localisation mitochondriaux connus, localisés à l'extrémité N-terminale, le signal de la mitogaligine est en position interne. La construction d'une seconde série de vecteurs (figure 44) a permis de préciser ce signal d'adressage qui s'étend des acides aminés 31 à 47. La suppression de l'arginine 31 ou du tryptophane 47 délocalise totalement la protéine dans le cytosol (figure 45 et 46).

2. Activité cytotoxique de la mitogaligine.

2.1. Expression de la mitogaligine et croissance cellulaire.

Les conséquences de l'expression de la mitogaligine sur la croissance cellulaire ont été testées dans des clones stables et inductibles de cellules EcR-293. L'induction de l'expression de la mitogaligine provoque une diminution de la prolifération des cellules, ceci même en absence de production de cytogaligine (article figure 6). Ces résultats nous permettent de constater que l'expression de la mitogaligine est incompatible avec la croissance des cellules. De même, l'induction de l'expression de la mitogaligine chez *E.coli* provoque une inhibition complète de la croissance bactérienne (article figure 10)..

2.2. La mitogaligine induit la libération du cytochrome c.

La transfection de cellules HeLa par des vecteurs produisant la mitogaligine seule ou des formes tronquées de la mitogaligine (figures 45 et 46), indique que la déstabilisation des membranes mitochondriales, à l'origine du relargage du cytochrome c, peut être reliée à l'action de la mitogaligine. En effet, la fuite de cytochrome c vers le

cytosol est mise en évidence dès qu'une forme mitochondriale de la mitogaligine est produite, ceci même en absence de la cytogaligine.

Les expériences de délétion montrent que la mitogaligine même réduite au seul signal d'adressage est suffisante pour induire la libération de cytochrome *c*. Dès que la protéine est délocalisée de la mitochondrie par un signal non fonctionnel, la fuite de cytochrome *c* n'est plus révélée. L'activité cytotoxique de la mitogaligine est également mise en évidence par l'incubation de mitochondries isolées avec des peptides dérivés de la mitogaligine. De premières observations ont révélé le peptide MG [35-53] comme le plus efficace pour agréger des mitochondries isolées. Ce peptide, qui chevauche la séquence d'adressage mitochondrial, s'est avéré également le plus efficace pour induire la condensation et l'agrégation des organites après micro-injection cellulaire (article, figure 9). Il faut cependant garder à l'esprit que les peptides MG [12-34] et MG [55-75] sont eux aussi capables d'induire l'agrégation et le relargage de cytochrome *c* à partir de mitochondries isolées mais à un niveau moindre que MG [35-53] (article figure 11). D'après des résultats récents obtenus au laboratoire par Patrick Gonzalez, il apparaît que le peptide MG [31-53] est plus efficace que le peptide MG [35-53] en ce qui concerne les propriétés d'interaction avec les mitochondries et d'agrégation de ces organites. Ces résultats suggèrent des interactions directes des peptides avec les membranes mitochondriales et également que les propriétés cytotoxiques de la mitogaligine sont directement reliées à sa séquence d'adressage. Ceci n'est pas surprenant puisque la mitogaligine présente des similitudes structurales (taux important de résidus tryptophane et haute teneur en résidus cationiques et proline) avec les peptides antimicrobiens tels que l'indolicidine et la tritrypticine, peptides connus pour leur capacité à déstabiliser les membranes biologiques (Schibli *et al.*, 2002 ; Selsted *et al.*, 1992; Shai, 1999). Les travaux menés au laboratoire par Patrick Gonzalez montrent également que l'interaction des peptides de la mitogaligine dépend de liaisons électrostatiques mais aussi de la composition lipidique des membranes. Ainsi, les peptides de la mitogaligine interagissent davantage avec des vésicules lipidiques contenant de la cardiolipine, phospholipide anionique spécifique de la mitochondrie. Ceci a également été décrit pour le ciblage et l'ancrage de tBid à la membrane mitochondriale ce qui favorise son activité de perméabilisation (Lutter *et al.*, 2000 ; Lutter *et al.*, 2001).

Il est connu et admis que la relocalisation de Bax et tBid depuis le cytosol vers les mitochondries induit la libération du cytochrome *c* (Eskes *et al.*, 1998 ; Finucane *et al.*, 1999 ; Jurgensmeier *et al.*, 1998; Rosse *et al.*, 1998). Dans un premier temps, cette libération a été attribuée à leur capacité de moduler l'ouverture du PTP (Jurgensmeier *et al.*, 1998 ; Marchetti *et al.*, 1996 ; Zamzami *et al.*, 1995). Il a également été proposé que Bax puisse former des pores seul ou avec le VDAC, au niveau de la membrane externe de la mitochondrie, permettant ainsi le relargage de molécules effectrices de la mort

cellulaire (Antonsson *et al.*, 1997 ; Shimizu *et al.*, 1999). Les méthodes empruntées au domaine d'étude des peptides antimicrobiens ont permis de mettre en évidence la formation de ces pores (Basanez *et al.*, 2002; Epanand *et al.*, 2002b). En effet, il a été démontré qu'au moins 4 molécules de Bax peuvent former un pore de 22 Å capable de laisser passer le cytochrome *c* (Saito *et al.*, 2000). Lors de l'apoptose, il a été démontré que Bax était présent sous forme d'oligomères au niveau de la membrane externe de la mitochondrie et que cette oligomérisation de Bax était nécessaire pour former ce pore (Antonsson *et al.*, 2000).

En tenant compte des données obtenues avec les protéines pro-apoptotiques Bax, tBid ou Bak nous pouvons suggérer un modèle d'action pour la mitogaligine. A l'image de Bak, la mitogaligine pourrait, sous l'effet d'un signal de mort, subir un changement de conformation la conduisant à se multimériser pour former un pore et relarguer le cytochrome *c*. Dans ce modèle, la perméabilisation de la membrane mitochondriale ne nécessite pas d'autres partenaires protéiques. Cette donnée n'est pas en contradiction avec ce qui a pu déjà être démontré. En effet, la perméabilisation de la mitochondrie survient lors de l'incubation directe de peptides synthétiques issus de la mitogaligine avec des mitochondries isolées. Ainsi, cette observation nous laisse supposer qu'aucun partenaire n'est requis pour que la mitogaligine induise la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe et la libération du cytochrome *c*.

3. Importance de la production des deux protéines codées par *galig*.

Si la mitochondrie joue un rôle certain dans la cytotoxicité de *galig*, il n'en reste pas moins que le mécanisme d'action des galigines reste encore indéterminé. Les résultats obtenus indiquent l'importance de la mitogaligine dans ce processus de mort. Cependant, on ne peut attribuer la mort cellulaire qu'à la seule production de mitogaligine. Les vecteurs d'expression produisant la mitogaligine mais pas la cytogaligine ne sont pas efficaces pour enclencher la mort. Les mitochondries apparaissent légèrement condensées mais les cellules ne présentent pas les profondes altérations morphologiques typiques de l'expression de *galig*. La fuite de cytochrome *c* liée à l'expression de la seule mitogaligine n'est donc pas un critère suffisant pour déclencher le processus de mort. Ce résultat suppose que pour obtenir un effet toxique maximal, il est nécessaire que les deux protéines soient produites. De plus, l'obtention de clones stables produisant uniquement la mitogaligine-EGFP est possible, même si l'expression de la mitogaligine-EGFP ralentit la croissance cellulaire (article, figure 6). Par contre, la sélection de clones produisant à la fois la mitogaligine-EGFP et la cytogaligine s'est toujours révélée négative même lorsque des vecteurs inductibles ont été utilisés. Le

simple fait d'obtenir un niveau basal d'expression lié à la fuite du promoteur apparaît suffisant pour empêcher la croissance des cellules transformées. De même que pour la mitogaligine, la cytogaligine n'est pas suffisante à elle seule pour entraîner la mort cellulaire bien qu'elle soit capable d'entraîner la fuite de cytochrome c de la mitochondrie (figure 48). Il semble que la perméabilisation des mitochondries soit un élément décisif mais, la libération du cytochrome c n'apparaît pas être le seul élément dans l'avènement de la mort induite par le gène *galig*. Le fait que la cytotoxicité liée à l'expression de *galig* nécessite les deux protéines pose la question d'une éventuelle interaction entre mitogaligine et cytogaligine. Ceci pourra être étudié par des expériences de co-immunoprécipitation. Un des points essentiels pour comprendre les mécanismes de mort du gène *galig* sera de déterminer les cibles cellulaires et moléculaires de la cytogaligine. Est-ce que la cytogaligine potentialise directement ou indirectement l'effet de la mitogaligine ou est-ce que les deux galigines fonctionnent de manière indépendante ?

III. La régulation de l'expression du gène *galig*.

Le locus *LGLAS3* est une structure génique complexe. Une portion d'ADN du locus peut être traduite dans 3 cadres de lecture différents. Ce type d'organisation est rare chez les eucaryotes supérieurs. Une structure avoisinant le degré de complexité de *galig* est également décrite pour le locus *INK4a* (Quelle *et al.*, 1995). L'existence d'un second transcrite issu d'un promoteur interne a été mis en évidence (Stone *et al.*, 1995). Les transcrits codent les protéines p16^{INK4a} et p19^{ARF}. Les deux ORF sont chevauchantes et décalées au niveau de l'exon 2, les deux protéines traduites sont par conséquent totalement différentes. L'expression de p16^{INK4a} est spécifique, alors que celle de p19^{ARF} est ubiquitaire. Les deux protéines interviennent dans l'arrêt du cycle cellulaire. D'un point de vue évolutif, ces structures géniques complexes identifiées chez les virus et les procaryotes pourraient être considérées, chez les eucaryotes, comme des voies de régulation acquises sous la pression de sélection.

L'expression de *galig* relève de deux niveaux de régulation différents :

❖ Un niveau de régulation transcriptionnel.

L'expression de *galig* n'est pas ubiquitaire mais au contraire spécifique. Selon les types tissulaires, deux transcrits différents sont produits et résultent d'un épissage alternatif (figure 33). Le transcrite le plus court et le moins abondant est produit essentiellement dans le cœur et les muscles. Le transcrite le plus long, qui contient une longue séquence d'ARNm non traduite, est exprimé dans les leucocytes circulants (Guittaut *et al.*, 2001). Afin de pouvoir étudier plus précisément le niveau d'expression du gène dans des tissus normaux ou pathologiques et dans la mesure où les transcrits sont peu abondants, il a été mis au point une technique de détection des ARNm par RT-

PCR quantitative (chapitre 5). Cette technique permet de déterminer le niveau de transcription du gène *galig*, et de discriminer entre les 2 formes longue et courte des transcrits. Des expériences préliminaires tendent à montrer que le taux d'expression de la forme longue du transcrit est fortement augmenté dans le cœur de lupus érythémateux.

❖ **Un niveau de régulation traductionnel.**

Les résultats obtenus avec les anticorps (chapitre 4) puis sur la traduction de la cytogaligine (chapitre 5) indiquent plusieurs possibilités d'initiation de traduction pour la cytogaligine sur le transcrit le plus court (figure 56). Ce transcrit fait apparaître deux sites ATG supplémentaires en amont de celui trouvé dans l'exon 3 qui est utilisé pour initier la traduction de la cytogaligine à partir du transcrit le plus long. L'utilisation de ces codons devrait produire une cytogaligine plus longue de 3 ou 12 acides aminés suivant le codon utilisé (AUG_{321_323} ou AUG_{348_350}, figure 56). Il reste à déterminer quel codon est utilisé pour initier la production de cette protéine alternative. Les conséquences de la production de ces isoformes de la cytogaligine sur la cytotoxicité devront par la suite être étudiées. Est-ce que la localisation de ces protéines alternatives est identique ou différente de la forme produite à partir du long transcrit ?

Ces deux niveaux de régulation permettent probablement une régulation fine de l'expression du gène. Les mécanismes impliqués dans cette régulation ainsi que les molécules partenaires sont encore à caractériser. Il est certain que ce type de régulation à double niveau (transcription et traduction) permet également d'augmenter les fonctions du gène.

ANNEXES

Nom des plasmides	Protéines codées
pgalig	Mitogaligine et Cytogaligine
pMG galig	Mitogaligine
pCG galig	Cytogaligine
pORF2-EGFP	Mitogaligine-EGFP et Cytogaligine
pMG-EGFP	Mitogaligine-EGFP
pORF1-EGFP	Cytogaligine-EGFP et Mitogaligine
pCG-EGFP	Cytogaligine-EGFP
pORF2-DsRED2	Mitogaligine-DsRED2 et Cytogaligine
pMG-DsRED2	Mitogaligine-DsRED2
pORF1-DsRED2	Cytogaligine-DsRED2 et Mitogaligine
pCG-DsRED2	Cytogaligine-DsRED2
pEGFP N3	EGFP
pHG3	Galectine-3
pDsRED2	DsRED2
pGFP Bcl-XL	Bcl-XL-EGFP
pGFP Bcl-2	Bcl-2-EGFP
pBid DsRED 2	Bid-DsRED2
Délétions de la Mitogaligine pMG 31_54 EGFP....	Acides aminés 31 à 54 de la mitogaligine en fusion avec EGFP.

BIBLIOGRAPHIE

- Adams, J.M. et Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322-1326.
- Akahani, S., Nangia-Makker, P., Inohara, H., Kim, H.R. et Raz, A. (1997). Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family. *Cancer Res* 57, 5272-5276.
- Ameisen, J.C. (1996). The origin of programmed cell death. *Science* 272, 1278-1279.
- Ameisen, J.C. (1998). The evolutionary origin and role of programmed cell death in single-celled organisms: a new view of executioners, mitochondria, host-pathogen interactions, and the role of death in the process of natural selection. In *When cell dies, I*. (Wiley-Liss, ed. (Lockshin, R.A.; Zakeri, Z.; Tilly, J.L.)).
- Ameisen, J.C. (2002). On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death Differ* 9, 367-393.
- Ameisen, J.C., Estaquier, J., Idziorek, T. et De Bels, F. (1995). The relevance of apoptosis to AIDS pathogenesis. *Trends Cell Biol* 5, 27-32.
- Ameisen, J.C., Idziorek, T., Billaut-Multo, O., Loyens, M., Yissier, J.P., Potentier, A. et Ouaisi, A. (1996). Apoptosis in a unicellular eukaryote (*Trypanosoma cruzi*): Implications for the evolutionary origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival. *Parasitol Today* 12, 49.
- Anderson, P. (1997). Kinase cascades regulating entry into apoptosis. *Microbiol Mol Biol Rev* 61, 33-46.
- Anglade, P., Vyas, S., Hirsch, E.C. et Agid, Y. (1997). Apoptosis in dopaminergic neurons of the human substantia nigra during normal aging. *Histol Histopathol* 12, 603-610.
- Annaert, W.G., Becker, B., Kistner, U., Reth, M. et Jahn, R. (1997). Export of cellubrevin from the endoplasmic reticulum is controlled by BAP31. *J Cell Biol* 139, 1397-1410.
- Antonsson, B., Conti, F., Ciavatta, A., Montessuit, S., Lewis, S., Martinou, I., Bernasconi, L., Bernard, A., Mermod, J.J., Mazzei, G., Maundrell, K., Gambale, F., Sadoul, R. et Martinou, J.C. (1997). Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* 277, 370-372.
- Antonsson, B., Montessuit, S., Lauper, S., Eskes, R. et Martinou, J.C. (2000). Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J* 345, 271-278.
- Antonsson, B., Montessuit, S., Sanchez, B. et Martinou, J.C. (2001). Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem* 276, 11615-11623. Epub 12001 Jan 11612.
- Arnoult, D., Akarid, K., Grodet, A., Petit, P.X., Estaquier, J. et Ameisen, J.C. (2002). On the evolution of programmed cell death: apoptosis of the unicellular eukaryote *Leishmania major* involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization. *Cell Death Differ* 9, 65-81.
- Arnoult, D., Karbowski, M. et Youle, R.J. (2003). Caspase inhibition prevents the mitochondrial release of apoptosis-inducing factor. *Cell Death Differ* 10, 845-849.
- Ashkenazi, A. et Dixit, V.M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308.
- Badley, A.D., Roumier, T., Lum, J.J. et Kroemer, G. (2003). Mitochondrion-mediated apoptosis in HIV-1 infection. *Trends Pharmacol Sci* 24, 298-305.
- Bae, J., Leo, C.P., Hsu, S.Y. et Hsueh, A.J. (2000). MCL-1S, a splicing variant of the antiapoptotic BCL-2 family member MCL-1, encodes a proapoptotic protein possessing only the BH3 domain. *J Biol Chem* 275, 25255-25261.
- Baehrecke, E.H. (2002). How death shapes life during development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 779-787.
- Bakhshi, A., Jensen, J.P., Goldman, P., Wright, J.J., McBride, O.W., Epstein, A.L. et Korsmeyer, S.J. (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, 899-906.

- Balasubramanian, K. et Schroit, A.J. (2003). Aminophospholipid asymmetry: A matter of life and death. *Annu Rev Physiol* 65, 701-734. Epub 2002 May 2001.
- Barondes, S.H., Castronovo, V., Cooper, D.N., Cummings, R.D., Drickamer, K., Feizi, T., Gitt, M.A., Hirabayashi, J., Hughes, C., Kasai, K. et al. (1994). Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell* 76, 597-598.
- Basanez, G., Sharpe, J.C., Galanis, J., Brandt, T.B., Hardwick, J.M. et Zimmerberg, J. (2002). Bax-type apoptotic proteins porate pure lipid bilayers through a mechanism sensitive to intrinsic monolayer curvature. *J Biol Chem* 277, 49360-49365. Epub 42002 Oct 49314.
- Baumler, C.B., Bohler, T., Herr, I., Benner, A., Krammer, P.H. et Debatin, K.M. (1996). Activation of the CD95 (APO-1/Fas) system in T cells from human immunodeficiency virus type-1-infected children. *Blood* 88, 1741-1746.
- Benson, R.S., Dive, C. et Watson, A.J. (1998). Comparative effects of Bcl-2 over-expression and ZVAD.FMK treatment on dexamethasone and VP16-induced apoptosis in CEM cells. *Cell Death Differ* 5, 432-439.
- Bernardi, P. (1999). Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev* 79, 1127-1155.
- Berridge, M.J. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361, 315-325.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D. et Lipp, P. (1998). Calcium--a life and death signal. *Nature* 395, 645-648.
- Bingle, C.D., Craig, R.W., Swales, B.M., Singleton, V., Zhou, P. et Whyte, M.K. (2000). Exon skipping in Mcl-1 results in a bcl-2 homology domain 3 only gene product that promotes cell death. *J Biol Chem* 275, 22136-22146.
- Birnboim, H.C. et Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Boehning, D., Patterson, R.L., Sedaghat, L., Glebova, N.O., Kurosaki, T. et Snyder, S.H. (2003). Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol* 5, 1051-1061. Epub 2003 Nov 1009.
- Boi, S., Solda, G. et Tenchini, M.L. (2004). Shedding light on the dark side of the genome: overlapping genes in higher eucaryotes. *Current Genomics* 5.
- Boise, L.H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X., Nunez, G. et Thompson, C.B. (1993). bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74, 597-608.
- Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V. et Wallach, D. (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85, 803-815.
- Borner, C. et Monney, L. (1999). Apoptosis without caspases: an inefficient molecular guillotine? *Cell Death Differ* 6, 497-507.
- Bossy-Wetzell, E., Newmeyer, D.D. et Green, D.R. (1998). Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *Embo J* 17, 37-49.
- Breckenridge, D.G., Stojanovic, M., Marcellus, R.C. et Shore, G.C. (2003). Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol. *J Cell Biol* 160, 1115-1127.
- Brown, D.M., Warner, G.L., Ales-Martinez, J.E., Scott, D.W. et Phipps, R.P. (1992). Prostaglandin E2 induces apoptosis in immature normal and malignant B lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol* 63, 221-229.

- Buckman, J.F., Hernandez, H., Kress, G.J., Votyakova, T.V., Pal, S. et Reynolds, I.J. (2001). MitoTracker labeling in primary neuronal and astrocytic cultures: influence of mitochondrial membrane potential and oxidants. *J Neurosci Methods* 104, 165-176.
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X. et Wang, X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 269-290.
- Bump, N.J., Hackett, M., Hugunin, M., Seshagiri, S., Brady, K., Chen, P., Ferenz, C., Franklin, S., Ghayur, T., Li, P. et al. (1995). Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science* 269, 1885-1888.
- Bursch, W. (2001). The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ* 8, 569-581.
- Cai, J. et Jones, D.P. (1998). Superoxide in apoptosis. Mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss. *J Biol Chem* 273, 11401-11404.
- Campisi, J. (2001). Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol* 11, S27-31.
- Cande, C., Vahsen, N., Garrido, C. et Kroemer, G. (2004). Apoptosis-inducing factor (AIF): caspase-independent after all. *Cell Death Differ* 11, 591-595.
- Cao, X., Deng, X. et May, W.S. (2003). Cleavage of Bax to p18 Bax accelerates stress-induced apoptosis, and a cathepsin-like protease may rapidly degrade p18 Bax. *Blood* 102, 2605-2614. Epub 2003 Jun 2619.
- Cardone, M.H., Salvesen, G.S., Widmann, C., Johnson, G. et Frisch, S.M. (1997). The regulation of anoikis: MEKK-1 activation requires cleavage by caspases. *Cell* 90, 315-323.
- Cartron, P.F., Gallenne, T., Bougras, G., Gautier, F., Manero, F., Vusio, P., Meflah, K., Vallette, F.M. et 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, 807-818.
- Cartron, P.F., Oliver, L., Juin, P., Meflah, K. et Vallette, F.M. (2004b). The p18 truncated form of Bax behaves like a Bcl-2 homology domain 3-only protein. *J Biol Chem* 279, 11503-11512. Epub 12003 Dec 11517.
- Cartron, P.F., Oliver, L., Martin, S., Moreau, C., LeCabellec, M.T., Jezequel, P., Meflah, K. et Vallette, F.M. (2002). The expression of a new variant of the pro-apoptotic molecule Bax, Baxpsi, is correlated with an increased survival of glioblastoma multiforme patients. *Hum Mol Genet* 11, 675-687.
- Cartron, P.F., Oliver, L., Mayat, E., Meflah, K. et Vallette, F.M. (2004c). Impact of pH on Bax alpha conformation, oligomerisation and mitochondrial integration. *FEBS Lett* 578, 41-46.
- Cartron, P.F., Priault, M., Oliver, L., Meflah, K., Manon, S. et Vallette, F.M. (2003). The N-terminal end of Bax contains a mitochondrial-targeting signal. *J Biol Chem* 278, 11633-11641. Epub 12003 Jan 11615.
- Chao, D.T. et Korsmeyer, S.J. (1998). BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 16, 395-419.
- Chaudhary, P.M., Eby, M.T., Jasmin, A., Kumar, A., Liu, L. et Hood, L. (2000). Activation of the NF-kappaB pathway by caspase 8 and its homologs. *Oncogene* 19, 4451-4460.
- Chen, M., Ona, V.O., Li, M., Ferrante, R.J., Fink, K.B., Zhu, S., Bian, J., Guo, L., Farrell, L.A., Hersch, S.M., Hobbs, W., Vonsattel, J.P., Cha, J.H. et Friedlander, R.M. (2000). Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nat Med* 6, 797-801.
- Cheng, E.H., Kirsch, D.G., Clem, R.J., Ravi, R., Kastan, M.B., Bedi, A., Ueno, K. et Hardwick, J.M. (1997). Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* 278, 1966-1968.
- Conlon, I. et Raff, M. (1999). Size control in animal development. *Cell* 96, 235-244.
- Conus, S., Kaufmann, T., Fellay, I., Otter, I., Rosse, T. et Borner, C. (2000). Bcl-2 is a monomeric protein: prevention of homodimerization by structural constraints. *Embo J* 19, 1534-1544.

- Cornillon, S., Foa, C., Davoust, J., Buonavista, N., Gross, J.D. et Golstein, P. (1994). Programmed cell death in Dictyostelium. *J Cell Sci* 107, 2691-2704.
- Couzinet, A., Herincs, Z. et Hueber, A.O. (2002). Programmed cell death' regulation: Towards a more dynamic conception. *Med Sci (Paris)* 18, 841-852.
- Cramer, W.A., Heymann, J.B., Schendel, S.L., Deriy, B.N., Cohen, F.S., Elkins, P.A. et Stauffacher, C.V. (1995). Structure-function of the channel-forming colicins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 24, 611-641.
- Crompton, M. (1999). The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 341, 233-249.
- Crouch, S.P. (2000). Biocompatibility testing using ATP bioluminescence. *Med Device Technol* 11, 12-15.
- Datta, R., Kojima, H., Yoshida, K. et Kufe, D. (1997a). Caspase-3-mediated cleavage of protein kinase C theta in induction of apoptosis. *J Biol Chem* 272, 20317-20320.
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. et Greenberg, M.E. (1997b). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241.
- Daugas, E., Nochy, D., Ravagnan, L., Loeffler, M., Susin, S.A., Zamzami, N. et Kroemer, G. (2000). Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Lett* 476, 118-123.
- Davidson, F.F. et Steller, H. (1998). Blocking apoptosis prevents blindness in Drosophila retinal degeneration mutants. *Nature* 391, 587-591.
- Desagher, S. et Martinou, J.C. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 10, 369-377.
- Desagher, S., Osen-Sand, A., Nichols, A., Eskes, R., Montessuit, S., Lauper, S., Maundrell, K., Antonsson, B. et Martinou, J.C. (1999). Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol* 144, 891-901.
- Deshmukh, M. et Johnson, E.M., Jr. (1998). Evidence of a novel event during neuronal death: development of competence-to-die in response to cytoplasmic cytochrome c. *Neuron* 21, 695-705.
- Deshmukh, M., Kuida, K. et Johnson, E.M., Jr. (2000). Caspase inhibition extends the commitment to neuronal death beyond cytochrome c release to the point of mitochondrial depolarization. *J Cell Biol* 150, 131-143.
- Deveraux, Q.L., Roy, N., Stennicke, H.R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Salvesen, G.S. et Reed, J.C. (1998). IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *Embo J* 17, 2215-2223.
- Dive, C., Gregory, C.D., Phipps, D.J., Evans, D.L., Milner, A.E. et Wyllie, A.H. (1992). Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. *Biochim Biophys Acta* 1133, 275-285.
- Dong, Z., Saikumar, P., Weinberg, J.M. et Venkatachalam, M.A. (1997). Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement of serine but not cysteine proteases. *Am J Pathol* 151, 1205-1213.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. et Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102, 33-42.
- Duckett, C.S., Nava, V.E., Gedrich, R.W., Clem, R.J., Van Dongen, J.L., Gilfillan, M.C., Shiels, H., Hardwick, J.M. et Thompson, C.B. (1996). A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *Embo J* 15, 2685-2694.
- Duvall, E., Wyllie, A.H. et Morris, R.G. (1985). Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis). *Immunology* 56, 351-358.

- Dyson, J.E., Simmons, D.M., Daniel, J., McLaughlin, J.M., Quirke, P. et Bird, C.C. (1986). Kinetic and physical studies of cell death induced by chemotherapeutic agents or hyperthermia. *Cell Tissue Kinet* 19, 311-324.
- Earnshaw, W.C., Martins, L.M. et Kaufmann, S.H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68, 383-424.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. et Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50.
- Epanand, R.F., Martinou, J.C., Montessuit, S. et Epanand, R.M. (2002a). Membrane perturbations induced by the apoptotic Bax protein. *Biochem J* 367, 849-855.
- Epanand, R.F., Martinou, J.C., Montessuit, S., Epanand, R.M. et Yip, C.M. (2002b). Direct evidence for membrane pore formation by the apoptotic protein Bax. *Biochem Biophys Res Commun* 298, 744-749.
- Eskes, R., Antonsson, B., Osen-Sand, A., Montessuit, S., Richter, C., Sadoul, R., Mazzei, G., Nichols, A. et Martinou, J.C. (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, 217-224.
- Esposito, L.A., Melov, S., Panov, A., Cottrell, B.A. et Wallace, D.C. (1999). Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4820-4825.
- Esposti, M.D. (1998). Apoptosis: who was first? *Cell Death Differ* 5, 719.
- Estaquier, J., Idziorek, T., Zou, W., Emilie, D., Farber, C.M., Bourez, J.M. et Ameisen, J.C. (1995). T helper type 1/T helper type 2 cytokines and T cell death: preventive effect of interleukin 12 on activation-induced and CD95 (FAS/APO-1)-mediated apoptosis of CD4⁺ T cells from human immunodeficiency virus-infected persons. *J Exp Med* 182, 1759-1767.
- Everett, H. et McFadden, G. (1999). Apoptosis: an innate immune response to virus infection. *Trends Microbiol* 7, 160-165.
- Faccio, L., Fusco, C., Chen, A., Martinotti, S., Bonventre, J.V. et Zervos, A.S. (2000). Characterization of a novel human serine protease that has extensive homology to bacterial heat shock endoprotease HtrA and is regulated by kidney ischemia. *J Biol Chem* 275, 2581-2588.
- Fadeel, B., Zhivotovsky, B. et Orrenius, S. (1999). All along the watchtower: on the regulation of apoptosis regulators. *Faseb J* 13, 1647-1657.
- Fadok, V.A., Bratton, D.L., Frasch, S.C., Warner, M.L. et Henson, P.M. (1998). The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ* 5, 551-562.
- Fadok, V.A., Bratton, D.L., Rose, D.M., Pearson, A., Ezekewitz, R.A. et Henson, P.M. (2000). A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 405, 85-90.
- Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L. et Henson, P.M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 148, 2207-2216.
- Finucane, D.M., Bossy-Wetzel, E., Waterhouse, N.J., Cotter, T.G. et Green, D.R. (1999). Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL. *J Biol Chem* 274, 2225-2233.
- Fischer, H., Koenig, U., Eckhart, L. et Tschachler, E. (2002). Human caspase 12 has acquired deleterious mutations. *Biochem Biophys Res Commun* 293, 722-726.
- Fleckenstein, A., Janke, J., Doring, H.J. et Leder, O. (1974). Myocardial fiber necrosis due to intracellular Ca overload—a new principle in cardiac pathophysiology. *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab* 4, 563-580.
- Frank, S., Gaume, B., Bergmann-Leitner, E.S., Leitner, W.W., Robert, E.G., Catez, F., Smith, C.L. et Youle, R.J. (2001). The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell* 1, 515-525.

- Furuichi, T., Yoshikawa, S., Miyawaki, A., Wada, K., Maeda, N. et Mikoshiba, K. (1989). Primary structure and functional expression of the inositol 1,4,5-trisphosphate-binding protein P400. *Nature* 342, 32-38.
- Gagliardini, V., Fernandez, P.A., Lee, R.K., Drexler, H.C., Rotello, R.J., Fishman, M.C. et Yuan, J. (1994). Prevention of vertebrate neuronal death by the crmA gene. *Science* 263, 826-828.
- Garvey, T.L., Bertin, J., Siegel, R.M., Wang, G.H., Lenardo, M.J. et Cohen, J.I. (2002). Binding of FADD and caspase-8 to molluscum contagiosum virus MC159 v-FLIP is not sufficient for its antiapoptotic function. *J Virol* 76, 697-706.
- Gervais, F.G., Singaraja, R., Xanthoudakis, S., Gutekunst, C.A., Leavitt, B.R., Metzler, M., Hackam, A.S., Tam, J., Vaillancourt, J.P., Houtzager, V., Rasper, D.M., Roy, S., Hayden, M.R. et Nicholson, D.W. (2002). Recruitment and activation of caspase-8 by the Huntingtin-interacting protein Hip-1 and a novel partner Hip1. *Nat Cell Biol* 4, 95-105.
- Ghayur, T., Hugunin, M., Talanian, R.V., Ratnofsky, S., Quinlan, C., Emoto, Y., Pandey, P., Datta, R., Huang, Y., Kharbanda, S., Allen, H., Kamen, R., Wong, W. et Kufe, D. (1996). Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE/CED 3-like protease induces characteristics of apoptosis. *J Exp Med* 184, 2399-2404.
- Gilmore, K. et Wilson, M. (1999). The use of chloromethyl-X-rosamine (Mitotracker red) to measure loss of mitochondrial membrane potential in apoptotic cells is incompatible with cell fixation. *Cytometry* 36, 355-358.
- Glucksmann, A. (1951). Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol Rev Camb Philos Soc* 26, 59-86.
- Gogvadze, V., Robertson, J.D., Enoksson, M., Zhivotovsky, B. et Orrenius, S. (2004). Mitochondrial cytochrome c release may occur by volume-dependent mechanisms not involving permeability transition. *Biochem J* 378, 213-217.
- Goldstein, J.C., Waterhouse, N.J., Juin, P., Evan, G.I. et Green, D.R. (2000). The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol* 2, 156-162.
- Golstein, P., Aubry, L. et Levraud, J.P. (2003). Cell-death alternative model organisms: why and which? *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 798-807.
- Goping, I.S., Gross, A., Lavoie, J.N., Nguyen, M., Jemmerson, R., Roth, K., Korsmeyer, S.J. et Shore, G.C. (1998). Regulated targeting of BAX to mitochondria. *J Cell Biol* 143, 207-215.
- Green, D.R. et Reed, J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.
- Grinberg, M., Sarig, R., Zaltsman, Y., Frumkin, D., Grammatikakis, N., Reuveny, E. et Gross, A. (2002). tBID Homooligomerizes in the mitochondrial membrane to induce apoptosis. *J Biol Chem* 277, 12237-12245. Epub 12002 Jan 12222.
- Gross, A., Jockel, J., Wei, M.C. et Korsmeyer, S.J. (1998). Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Embo J* 17, 3878-3885.
- Gross, A., McDonnell, J.M. et Korsmeyer, S.J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13, 1899-1911.
- Gugliucci, A., Ranzato, L., Scorrano, L., Colonna, R., Petronilli, V., Cusan, C., Prato, M., Mancini, M., Pagano, F. et Bernardi, P. (2002). Mitochondria are direct targets of the lipoxigenase inhibitor MK886. A strategy for cell killing by combined treatment with MK886 and cyclooxygenase inhibitors. *J Biol Chem* 277, 31789-31795. Epub 32002 Jun 31721.
- Guihard, G., Bellot, G., Moreau, C., Pradal, G., Ferry, N., Thomy, R., Fichet, P., Meflah, K. et Vallette, F.M. (2004). The mitochondrial apoptosis-induced channel (MAC) corresponds to a late apoptotic event. *J Biol Chem* 279, 46542-46550. Epub 42004 Aug 46524.
- Guimaraes, A.C. et Linden, R. (2004). Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. *Eur J Biochem* 271, 1638-1650.

- Guittaut, M., Charpentier, S., Normand, T., Dubois, M., Raimond, J. et Legrand, A. (2001). Identification of an internal gene to the human Galectin-3 gene with two different overlapping reading frames that do not encode Galectin-3. *J Biol Chem* 276, 2652-2657.
- Haecker, G. et Vaux, D.L. (1994). Viral, worm and radical implications for apoptosis. *Trends Biochem Sci* 19, 99-100.
- Haga, N., Fujita, N. et Tsuruo, T. (2003). Mitochondrial agrégation precedes cytochrome c release from mitochondria during apoptosis. *Oncogene* 22, 5579-5585.
- Haldar, S., Jena, N. et Croce, C.M. (1995). Inactivation of Bcl-2 by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4507-4511.
- Hamann, K.K., Cowles, E.A., Wang, J.L. et Anderson, R.L. (1991). Expression of carbohydrate binding protein 35 in human fibroblasts: variations in the levels of mRNA, protein, and isoelectric species as a function of replicative competence. *Exp Cell Res* 196, 82-91.
- Hawkins, C.J., Uren, A.G., Hacker, G., Medcalf, R.L. et Vaux, D.L. (1996). Inhibition of interleukin 1 beta-converting enzyme-mediated apoptosis of mammalian cells by baculovirus IAP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13786-13790.
- Hayflick, L. et Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25, 585-621.
- Hegde, R., Srinivasula, S.M., Zhang, Z., Wassell, R., Mukattash, R., Cilenti, L., DuBois, G., Lazebnik, Y., Zervos, A.S., Fernandes-Alnemri, T. et Alnemri, E.S. (2002). Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem* 277, 432-438. Epub 2001 Oct 2017.
- Hengartner, M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776.
- Hengartner, M.O. et Horvitz, H.R. (1994). C. elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2. *Cell* 76, 665-676.
- Henson, P.M. et Johnston, R.B., Jr. (1987). Tissue injury in inflammation. Oxidants, proteinases, and cationic proteins. *J Clin Invest* 79, 669-674.
- Hockenbery, D., Nunez, G., Milliman, C., Schreiber, R.D. et Korsmeyer, S.J. (1990). Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348, 334-336.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. et Harris, C.C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science* 253, 49-53.
- Horvitz, H.R. (1999). Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res* 59, 1701s-1706s.
- Horvitz, H.R., Sternberg, P.W., Greenwald, I.S., Fixsen, W. et Ellis, H.M. (1983). Mutations that affect neural cell lineages and cell fates during the development of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 48, 453-463.
- Hu, S., Vincenz, C., Buller, M. et Dixit, V.M. (1997). A novel family of viral death effector domain-containing molecules that inhibit both CD-95- and tumor necrosis factor receptor-1-induced apoptosis. *J Biol Chem* 272, 9621-9624.
- Hu, Y., Benedict, M.A., Wu, D., Inohara, N. et Nunez, G. (1998). Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4386-4391.
- Huang, T.T., Carlson, E.J., Raineri, I., Gillespie, A.M., Kozy, H. et Epstein, C.J. (1999). The use of transgenic and mutant mice to study oxygen free radical metabolism. *Ann N Y Acad Sci* 893, 95-112.
- Inoue, K., Kohno, T., Takakura, S., Hayashi, Y., Mizoguchi, H. et Yokota, J. (2000). Frequent microsatellite instability and BAX mutations in T cell acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Leuk Res* 24, 255-262.

- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L.E. et Tschopp, J. (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388, 190-195.
- Jaattela, M. (1999). Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp Cell Res* 248, 30-43.
- Jackson, G.R., Salecker, I., Dong, X., Yao, X., Arnheim, N., Faber, P.W., MacDonald, M.E. et Zipursky, S.L. (1998). Polyglutamine-expanded human huntingtin transgenes induce degeneration of Drosophila photoreceptor neurons. *Neuron* 21, 633-642.
- Jacobson, M.D., Weil, M. et Raff, M.C. (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell* 88, 347-354.
- Jagasia, R., Grote, P., Westermann, B. et Conradt, B. (2005). DRP-1-mediated mitochondrial fragmentation during EGL-1-induced cell death in *C. elegans*. *Nature* 433, 754-760.
- Janicke, R.U., Sprengart, M.L., Wati, M.R. et Porter, A.G. (1998). Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem* 273, 9357-9360.
- Jimbo, A., Fujita, E., Kouroku, Y., Ohnishi, J., Inohara, N., Kuida, K., Sakamaki, K., Yonehara, S. et Momoi, T. (2003). ER stress induces caspase-8 activation, stimulating cytochrome c release and caspase-9 activation. *Exp Cell Res* 283, 156-166.
- Jin, S., Kalkum, M., Overholtzer, M., Stoffel, A., Chait, B.T. et Levine, A.J. (2003). CIAP1 and the serine protease HTRA2 are involved in a novel p53-dependent apoptosis pathway in mammals. *Genes Dev* 17, 359-367.
- Johnson, M.D., Xiang, H., London, S., Kinoshita, Y., Knudson, M., Mayberg, M., Korsmeyer, S.J. et Morrison, R.S. (1998). Evidence for involvement of Bax and p53, but not caspases, in radiation-induced cell death of cultured postnatal hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 54, 721-733.
- Johnstone, R.W., Ruefli, A.A. et Lowe, S.W. (2002). Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 108, 153-164.
- Jones, J.M., Datta, P., Srinivasula, S.M., Ji, W., Gupta, S., Zhang, Z., Davies, E., Hajnoczky, G., Saunders, T.L., Van Keuren, M.L., Fernandes-Alnemri, T., Meisler, M.H. et Alnemri, E.S. (2003). Loss of Omi mitochondrial protease activity causes the neuromuscular disorder of mnd2 mutant mice. *Nature* 425, 721-727. Epub 2003 Oct 2008.
- Joza, N., Susin, S.A., Daugas, E., Stanford, W.L., Cho, S.K., Li, C.Y., Sasaki, T., Elia, A.J., Cheng, H.Y., Ravagnan, L., Ferri, K.F., Zamzami, N., Wakeham, A., Hakem, R., Yoshida, H., Kong, Y.Y., Mak, T.W., Zuniga-Pflucker, J.C., Kroemer, G. et Penninger, J.M. (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410, 549-554.
- Juin, P., Pelletier, M., Oliver, L., Tremblais, K., Gregoire, M., Meflah, K. et Vallette, F.M. (1998). Induction of a caspase-3-like activity by calcium in normal cytosolic extracts triggers nuclear apoptosis in a cell-free system. *J Biol Chem* 273, 17559-17564.
- Jurgensmeier, J.M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D. et Reed, J.C. (1998). Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4997-5002.
- Kane, D.J., Sarafian, T.A., Anton, R., Hahn, H., Gralla, E.B., Valentine, J.S., Ord, T. et Bredesen, D.E. (1993). Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* 262, 1274-1277.
- Karbowski, M., Lee, Y.J., Gaume, B., Jeong, S.Y., Frank, S., Nechushtan, A., Santel, A., Fuller, M., Smith, C.L. et Youle, R.J. (2002). Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. *J Cell Biol* 159, 931-938. Epub 2002 Dec 2003.
- Kawane, K., Fukuyama, H., Kondoh, G., Takeda, J., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y. et Nagata, S. (2001). Requirement of DNase II for definitive erythropoiesis in the mouse fetal liver. *Science* 292, 1546-1549.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. et Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.

- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Kramer, P.H. et Peter, M.E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* 14, 5579-5588.
- Kitanaka, C. et Kuchino, Y. (1999). Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology. *Cell Death Differ* 6, 508-515.
- Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R. et Newmeyer, D.D. (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275, 1132-1136.
- Kluck, R.M., Esposti, M.D., Perkins, G., Renken, C., Kuwana, T., Bossy-Wetzel, E., Goldberg, M., Allen, T., Barber, M.J., Green, D.R. et Newmeyer, D.D. (1999). The pro-apoptotic proteins, Bid and Bax, cause a limited permeabilization of the mitochondrial outer membrane that is enhanced by cytosol. *J Cell Biol* 147, 809-822.
- Ko, J.K., Lee, M.J., Cho, S.H., Cho, J.A., Lee, B.Y., Koh, J.S., Lee, S.S., Shim, Y.H. et Kim, C.W. (2003). Bfl-1S, a novel alternative splice variant of Bfl-1, localizes in the nucleus via its C-terminus and prevents cell death. *Oncogene* 22, 2457-2465.
- Komiyama, T., Ray, C.A., Pickup, D.J., Howard, A.D., Thornberry, N.A., Peterson, E.P. et 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, 19331-19337.
- Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T.J., Kirschner, M.W., Koths, K., Kwiatkowski, D.J. et Williams, L.T. (1997). Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278, 294-298.
- Kozak, M. (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* 15, 8125-8148.
- Kozak, M. (1997). Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position +4 but is not generally affected by the nucleotides in positions +5 and +6. *Embo J* 16, 2482-2492.
- Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M.J., Fenton, W. et Reed, J.C. (1993). Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res* 53, 4701-4714.
- Kramer, P.H. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407, 789-795.
- Kroemer, G., Petit, P., Zamzami, N., Vayssiere, J.L. et Mignotte, B. (1995). The biochemistry of programmed cell death. *Faseb J* 9, 1277-1287.
- Kroemer, G. et Reed, J.C. (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 6, 513-519.
- Kroemer, G., Zamzami, N. et Susin, S.A. (1997). Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 18, 44-51.
- Kudla, G., Montessuit, S., Eskes, R., Berrier, C., Martinou, J.C., Ghazi, A. et Antonsson, B. (2000). 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, 22713-22718.
- Kumar, S. (1999). Mechanisms mediating caspase activation in cell death. *Cell Death Differ* 6, 1060-1066.
- Kuwana, T., Mackey, M.R., Perkins, G., Ellisman, M.H., Latterich, M., Schneider, R., Green, D.R. et Newmeyer, D.D. (2002). Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* 111, 331-342.
- Labarriere, N., Selvais, P.L., Lemaigre, F.P., Michel, A., Maiter, D.M. et Rousseau, G.G. (1995). A novel transcriptional activator originating from an upstream promoter in human growth hormone gene. *J Biol Chem* 270, 19205-19208.
- Landowski, T.H., Qu, N., Buyuksal, I., Painter, J.S. et Dalton, W.S. (1997). Mutations in the Fas antigen in patients with multiple myeloma. *Blood* 90, 4266-4270.

- Lecoœur, H., Prevost, M.C. et Gougeon, M.L. (2001). Oncosis is associated with exposure of phosphatidylserine residues on the outside layer of the plasma membrane: a reconsideration of the specificity of the annexin V/propidium iodide assay. *Cytometry* 44, 65-72.
- Lee, N., MacDonald, H., Reinhard, C., Halenbeck, R., Roulston, A., Shi, T. et Williams, L.T. (1997). Activation of hPAK65 by caspase cleavage induces some of the morphological and biochemical changes of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13642-13647.
- Leist, M. et Jaattela, M. (2001). Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 589-598.
- Leonard, J.P. et Salpeter, M.M. (1979). Agonist-induced myopathy at the neuromuscular junction is mediated by calcium. *J Cell Biol* 82, 811-819.
- Levine, A.J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-331.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.J. et Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501.
- Li, J., Spletter, M.L., Johnson, D.A., Wright, L.S., Svendsen, C.N. et Johnson, J.A. (2005). Rotenone-induced caspase 9/3-independent and -dependent cell death in undifferentiated and differentiated human neural stem cells. *J Neurochem* 92, 462-476.
- Li, L.Y., Luo, X. et Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412, 95-99.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S. et Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489.
- Liston, P., Roy, N., Tamai, K., Lefebvre, C., Baird, S., Cherton-Horvat, G., Farahani, R., McLean, M., Ikeda, J.E., MacKenzie, A. et Korneluk, R.G. (1996). Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 379, 349-353.
- Liston, P., Young, S.S., Mackenzie, A.E. et Korneluk, R.G. (1997). Life and death decisions: the role of the IAPs in modulating programmed cell death. *Apoptosis* 2, 423-441.
- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R. et Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86, 147-157.
- Lockshin, R.A. (1969a). Lysosomes in insects., Amsterdam: North Holland Publishing edn (Amsterdam, In J.T Dingle & H. B. Fell).
- Lockshin, R.A. (1969b). Programmed cell death. Activation of lysis by a mechanism involving the synthesis of protein. *J Insect Physiol* 15, 1505-1516.
- Lockshin, R.A. et Williams, C.M. (1964). Programmed cell death. II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmths. *J Insect Physiol* 10, 643-649.
- Lockshin, R.A. et Zakeri, Z. (2001). Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 545-550.
- Lockshin, R.A. et Zakeri, Z. (2004a). Apoptosis, autophagy, and more. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 2405-2419.
- Lockshin, R.A. et Zakeri, Z. (2004b). Caspase-independent cell death? *Oncogene* 23, 2766-2773.
- Loeffler, M., Daugas, E., Susin, S.A., Zamzami, N., Metivier, D., Nieminen, A.L., Brothers, G., Penninger, J.M. et Kroemer, G. (2001). Dominant cell death induction by extramitochondrially targeted apoptosis-inducing factor. *Faseb J* 15, 758-767.
- Lu, T., Sathe, S.S., Swiatkowski, S.M., Hampole, C.V. et Stark, G.R. (2004). Secretion of cytokines and growth factors as a general cause of constitutive NFkappaB activation in cancer. *Oncogene* 23, 2138-2145.

- Lutter, M., Fang, M., Luo, X., Nishijima, M., Xie, X. et Wang, X. (2000). Cardiolipin provides specificity for targeting of tBid to mitochondria. *Nat Cell Biol* 2, 754-761.
- Lutter, M., Perkins, G.A. et Wang, X. (2001). The pro-apoptotic Bcl-2 family member tBid localizes to mitochondrial contact sites. *BMC Cell Biol* 2, 22. Epub 2001 Nov 2008.
- Majno, G. et Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146, 3-15.
- Mandruzzato, S., Brasseur, F., Andry, G., Boon, T. et van der Bruggen, P. (1997). A CASP-8 mutation recognized by cytolytic T lymphocytes on a human head and neck carcinoma. *J Exp Med* 186, 785-793.
- Marchetti, P., Castedo, M., Susin, S.A., Zamzami, N., Hirsch, T., Macho, A., Haeffner, A., Hirsch, F., Geuskens, M. et Kroemer, G. (1996). Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *J Exp Med* 184, 1155-1160.
- Martin, S.J., Reutelingsperger, C.P., McGahon, A.J., Rader, J.A., van Schie, R.C., LaFace, D.M. et Green, D.R. (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 182, 1545-1556.
- Martinou, J.C. et Green, D.R. (2001). Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 63-67.
- Martins, L.M., Morrison, A., Klupsch, K., Fedele, V., Moiso, N., Teismann, P., Abuin, A., Grau, E., Geppert, M., Livi, G.P., Creasy, C.L., Martin, A., Hargreaves, I., Heales, S.J., Okada, H., Brandner, S., Schulz, J.B., Mak, T. et Downward, J. (2004). Neuroprotective role of the Reaper-related serine protease HtrA2/Omi revealed by targeted deletion in mice. *Mol Cell Biol* 24, 9848-9862.
- Mattson, M.P. et Chan, S.L. (2003). Calcium orchestrates apoptosis. *Nat Cell Biol* 5, 1041-1043.
- McCarthy, N.J., Whyte, M.K., Gilbert, C.S. et Evan, G.I. (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, 215-227.
- Meier, P., Finch, A. et Evan, G. (2000). Apoptosis in development. *Nature* 407, 796-801.
- Meijer, H.A. et Thomas, A.A. (2002). Control of eukaryotic protein synthesis by upstream open reading frames in the 5'-untranslated region of an mRNA. *Biochem J* 367, 1-11.
- Melino, G. (2001). The Sirens' song. *Nature* 412, 23.
- Merino, R., Ganan, Y., Macias, D., Rodriguez-Leon, J. et Hurler, J.M. (1999). Bone morphogenetic proteins regulate interdigital cell death in the avian embryo. *Ann N Y Acad Sci* 887, 120-132.
- Merritt, A.J., Potten, C.S., Watson, A.J., Loh, D.Y., Nakayama, K. et Hickman, J.A. (1995). Differential expression of bcl-2 in intestinal epithelia. Correlation with attenuation of apoptosis in colonic crypts and the incidence of colonic neoplasia. *J Cell Sci* 108, 2261-2271.
- Mikhailov, V., Mikhailova, M., Degenhardt, K., Venkatachalam, M.A., White, E. et 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, 5367-5376. Epub 2002 Nov 5325.
- Miramar, M.D., Costantini, P., Ravagnan, L., Saraiva, L.M., Haouzi, D., Brothers, G., Penninger, J.M., Peleato, M.L., Kroemer, G. et Susin, S.A. (2001). NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *J Biol Chem* 276, 16391-16398. Epub 2001 Feb 16313.
- Miura, M., Zhu, H., Rotello, R., Hartwig, E.A. et Yuan, J. (1993). Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene ced-3. *Cell* 75, 653-660.
- Muchmore, S.W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Yoon, H.S., Nettekoven, D., Chang, B.S., Thompson, C.B., Wong, S.L., Ng, S.L. et Fesik, S.W. (1996). X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 381, 335-341.

- Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P.H., Peter, M.E. et Dixit, V.M. (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, 817-827.
- Nagata, S. (1999). Fas ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet* 33, 29-55.
- Nagata, S. (2000). Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* 256, 12-18.
- Nakagawa, T. et Yuan, J. (2000). Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol* 150, 887-894.
- Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Lin, A.W., Hearn, S.A., Spector, D.L., Hannon, G.J. et Lowe, S.W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 113, 703-716.
- Newmeyer, D.D., Farschon, D.M. et Reed, J.C. (1994). Cell-free apoptosis in *Xenopus* egg extracts: inhibition by Bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria. *Cell* 79, 353-364.
- Newmeyer, D.D. et Ferguson-Miller, S. (2003). Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* 112, 481-490.
- Nguyen, M., Millar, D.G., Yong, V.W., Korsmeyer, S.J. et Shore, G.C. (1993). Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *J Biol Chem* 268, 25265-25268.
- Nicholson, D.W. et Thornberry, N.A. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 22, 299-306.
- Nogal, M.L., Gonzalez de Buitrago, G., Rodriguez, C., Cubelos, B., Carrascosa, A.L., Salas, M.L. et Revilla, Y. (2001). African swine fever virus IAP homologue inhibits caspase activation and promotes cell survival in mammalian cells. *J Virol* 75, 2535-2543.
- Nomura, K., Imai, H., Koumura, T., Arai, M. et Nakagawa, Y. (1999). Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase suppresses apoptosis mediated by a mitochondrial death pathway. *J Biol Chem* 274, 29294-29302.
- Nutt, L.K., Chandra, J., Pataer, A., Fang, B., Roth, J.A., Swisher, S.G., O'Neil, R.G. et McConkey, D.J. (2002). Bax-mediated Ca²⁺ mobilization promotes cytochrome c release during apoptosis. *J Biol Chem* 277, 20301-20308. Epub 22002 Mar 20321.
- Obeid, L.M., Linardic, C.M., Karolak, L.A. et Hannun, Y.A. (1993). Programmed cell death induced by ceramide. *Science* 259, 1769-1771.
- Ochman, H., Gerber, A.S. et Hartl, D.L. (1988). Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* 120, 621-623.
- Ogier-Denis, E. et Codogno, P. (2003). Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer. *Biochim Biophys Acta* 1603, 113-128.
- Okada, H., Bakal, C., Shahinian, A., Elia, A., Wakeham, A., Suh, W.K., Duncan, G.S., Ciofani, M., Rottapel, R., Zuniga-Pflucker, J.C. et Mak, T.W. (2004). Survivin loss in thymocytes triggers p53-mediated growth arrest and p53-independent cell death. *J Exp Med* 199, 399-410.
- Okada, H. et Mak, T.W. (2004). Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer* 4, 592-603.
- Okuno, S., Shimizu, S., Ito, T., Nomura, M., Hamada, E., Tsujimoto, Y. et Matsuda, H. (1998). Bcl-2 prevents caspase-independent cell death. *J Biol Chem* 273, 34272-34277.
- Oltvai, Z.N., Milliman, C.L. et Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74, 609-619.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B. et Nicotera, P. (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 552-565.

- Packard, B.Z., Topytgin, D.D., Komoriya, A. et Brand, L. (1996). Profluorescent protease substrates: intramolecular dimers described by the exciton model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11640-11645.
- Palumbo, G.J., Buller, R.M. et Glasgow, W.C. (1994). Multigenic evasion of inflammation by poxviruses. *J Virol* 68, 1737-1749.
- Pavlov, E.V., Priault, M., Pietkiewicz, D., Cheng, E.H., Antonsson, B., Manon, S., Korsmeyer, S.J., Mannella, C.A. et Kinnally, K.W. (2001). A novel, high conductance channel of mitochondria linked to apoptosis in mammalian cells and Bax expression in yeast. *J Cell Biol* 155, 725-731. Epub 2001 Nov 2026.
- Pena, J.C., Fuchs, E. et Thompson, C.B. (1997). Bcl-x expression influences keratinocyte cell survival but not terminal differentiation. *Cell Growth Differ* 8, 619-629.
- Petit, F., Arnoult, D., Lelievre, J.D., Moutouh-de Parseval, L., Hance, A.J., Schneider, P., Corbeil, J., Ameisen, J.C. et Estaquier, J. (2002). Productive HIV-1 infection of primary CD4+ T cells induces mitochondrial membrane permeabilization leading to a caspase-independent cell death. *J Biol Chem* 277, 1477-1487. Epub 2001 Oct 1431.
- Pfanner, N., Craig, E.A. et Honlinger, A. (1997). Mitochondrial preprotein translocase. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 25-51.
- Pham, N.A., Robinson, B.H. et Hedley, D.W. (2000). Simultaneous detection of mitochondrial respiratory chain activity and reactive oxygen in digitonin-permeabilized cells using flow cytometry. *Cytometry* 41, 245-251.
- Pozniakovsky, A.I., Knorre, D.A., Markova, O.V., Hyman, A.A., Skulachev, V.P., Severin, F.F., Popov, A.V., Pozniakovsky, A., Arnal, I., Antony, C., Ashford, A.J., Kinoshita, K., Tournebize, R., Karsenti, E., Popov, A., Rybina, S., Mayer, T.U. et Walczak, C.E. (2005). Role of mitochondria in the pheromone- and amiodarone-induced programmed death of yeast
XMAP215 regulates microtubule dynamics through two distinct domains
Control of microtubule dynamics by the antagonistic activities of XMAP215 and XKCM1 in *Xenopus* egg extracts. *J Cell Biol* 168, 257-269.
- Priault, M., Bessoule, J.J., Grelaud-Coq, A., Camougrand, N. et Manon, S. (2002). Bax-induced cell death in yeast depends on mitochondrial lipid oxidation. *Eur J Biochem* 269, 5440-5450.
- Quelle, D.E., Cheng, M., Ashmun, R.A. et Sherr, C.J. (1997). Cancer-associated mutations at the INK4a locus cancel cell cycle arrest by p16INK4a but not by the alternative reading frame protein p19ARF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 669-673.
- Quelle, D.E., Zindy, F., Ashmun, R.A. et Sherr, C.J. (1995). Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 83, 993-1000.
- Raimond, J., Rouleux, F., Monsigny, M. et Legrand, A. (1995). The second intron of the human galectin-3 gene has a strong promoter activity down-regulated by p53. *FEBS Lett* 363, 165-169.
- Rampino, N., Yamamoto, H., Ionov, Y., Li, Y., Sawai, H., Reed, J.C. et Perucho, M. (1997). Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 275, 967-969.
- Renshaw, S.A., Dempsey, C.E., Barnes, F.A., Bagstaff, S.M., Dower, S.K., Bingle, C.D. et Whyte, M.K. (2004). Three novel Bid proteins generated by alternative splicing of the human Bid gene. *J Biol Chem* 279, 2846-2855. Epub 2003 Oct 2828.
- Ricci, J.E., Gottlieb, R.A. et Green, D.R. (2003). Caspase-mediated loss of mitochondrial function and generation of reactive oxygen species during apoptosis. *J Cell Biol* 160, 65-75. Epub 2003 Jan 2006.
- Rizzuto, R., Brini, M., Murgia, M. et Pozzan, T. (1993). Microdomains with high Ca²⁺ close to IP₃-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science* 262, 744-747.
- Rosse, T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, I., Jansen, B. et Borner, C. (1998). Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature* 391, 496-499.
- Rothe, M., Pan, M.G., Henzel, W.J., Ayres, T.M. et Goeddel, D.V. (1995). The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 83, 1243-1252.

- Roucou, X. et Martinou, J.C. (2001). Conformational change of Bax: a question of life or death. *Cell Death Differ* 8, 875-877.
- Roucou, X., Montessuit, S., Antonsson, B. et Martinou, J.C. (2002). Bax oligomerization in mitochondrial membranes requires tBid (caspase-8-cleaved Bid) and a mitochondrial protein. *Biochem J* 368, 915-921.
- Roy, N., Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S. et Reed, J.C. (1997). The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *Embo J* 16, 6914-6925.
- Ruffolo, S.C. et Shore, G.C. (2003). BCL-2 selectively interacts with the BID-induced open conformer of BAK, inhibiting BAK auto-oligomerization. *J Biol Chem* 278, 25039-25045. Epub 22003 Apr 25029.
- Russell, P. et Nurse, P. (1986). cdc25+ functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell* 45, 145-153.
- Sahara, S., Aoto, M., Eguchi, Y., Imamoto, N., Yoneda, Y. et Tsujimoto, Y. (1999). Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation. *Nature* 401, 168-173.
- Saito, M., Korsmeyer, S.J. et Schlesinger, P.H. (2000). BAX-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. *Nat Cell Biol* 2, 553-555.
- Saleh, A., Srinivasula, S.M., Balkir, L., Robbins, P.D. et Alnemri, E.S. (2000). Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol* 2, 476-483.
- Sato, S., Burdett, I. et Hughes, R.C. (1993). Secretion of the baby hamster kidney 30-kDa galactose-binding lectin from polarized and nonpolarized cells: a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *Exp Cell Res* 207, 8-18.
- Saunders, J.W., Jr. (1966). Death in embryonic systems. *Science* 154, 604-612.
- Scatena, C.D., Stewart, Z.A., Mays, D., Tang, L.J., Keefer, C.J., Leach, S.D. et Pietenpol, J.A. (1998). Mitotic phosphorylation of Bcl-2 during normal cell cycle progression and Taxol-induced growth arrest. *J Biol Chem* 273, 30777-30784.
- Schendel, S.L., Azimov, R., Pawlowski, K., Godzik, A., Kagan, B.L. et Reed, J.C. (1999). Ion channel activity of the BH3 only Bcl-2 family member, BID. *J Biol Chem* 274, 21932-21936.
- Schibli, D.J., Epand, R.F., Vogel, H.J. et Epand, R.M. (2002). Tryptophan-rich antimicrobial peptides: comparative properties and membrane interactions. *Biochem Cell Biol* 80, 667-677.
- Schlegel, R.A., Callahan, M., Krahling, S., Pradhan, D. et Williamson, P. (1996). Mechanisms for recognition and phagocytosis of apoptotic lymphocytes by macrophages. *Adv Exp Med Biol* 406, 21-28.
- Schlegel, R.A. et Williamson, P. (2001). Phosphatidylserine, a death knell. *Cell Death Differ* 8, 551-563.
- Schlesinger, P.H., Gross, A., Yin, X.M., Yamamoto, K., Saito, M., Waksman, G. et Korsmeyer, S.J. (1997). Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11357-11362.
- Schotte, P., Declercq, W., Van Huffel, S., Vandenaabeele, P. et Beyaert, R. (1999). Non-specific effects of methyl ketone peptide inhibitors of caspases. *FEBS Lett* 442, 117-121.
- Schwartz, L.M., Smith, S.W., Jones, M.E. et Osborne, B.A. (1993). Do all programmed cell deaths occur via apoptosis? *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 980-984.
- Schwartzman, R.A. et Cidlowski, J.A. (1993). Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev* 14, 133-151.
- Scorrano, L., Ashiya, M., Buttle, K., Weiler, S., Oakes, S.A., Mannella, C.A. et Korsmeyer, S.J. (2002). A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev Cell* 2, 55-67.

- Scorrano, L., Oakes, S.A., Opferman, J.T., Cheng, E.H., Sorcinelli, M.D., Pozzan, T. et Korsmeyer, S.J. (2003). BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science* 300, 135-139. Epub 2003 Mar 2006.
- Searle, J., Lawson, T.A., Abbott, P.J., Harmon, B. et Kerr, J.F. (1975). An electron-microscope study of the mode of cell death induced by cancer-chemotherapeutic agents in populations of proliferating normal and neoplastic cells. *J Pathol* 116, 129-138.
- Sebbagh, M., Renvoize, C., Hamelin, J., Riche, N., Bertoglio, J. et Breard, J. (2001). Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol* 3, 346-352.
- Selsted, M.E., Novotny, M.J., Morris, W.L., Tang, Y.Q., Smith, W. et Cullor, J.S. (1992). Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. *J Biol Chem* 267, 4292-4295.
- Sen, N., Das, B.B., Ganguly, A., Mukherjee, T., Bandyopadhyay, S. et Majumder, H.K. (2004). Camptothecin-induced imbalance in intracellular cation homeostasis regulates programmed cell death in unicellular hemoflagellate *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* 279, 52366-52375. Epub 2004 Sep 52368.
- Shaham, S. et Horvitz, H.R. (1996). Developing *Caenorhabditis elegans* neurons may contain both cell-death protective and killer activities. *Genes Dev* 10, 578-591.
- Shai, Y. (1999). Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta* 1462, 55-70.
- Shimizu, S., Ide, T., Yanagida, T. et 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, 12321-12325.
- Shimizu, S., Narita, M. et Tsujimoto, Y. (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399, 483-487.
- Shinjyo, T., Kuribara, R., Inukai, T., Hosoi, H., Kinoshita, T., Miyajima, A., Houghton, P.J., Look, A.T., Ozawa, K. et 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, 854-864.
- Silke, J., Ekert, P.G., Day, C.L., Hawkins, C.J., Baca, M., Chew, J., Pakusch, M., Verhagen, A.M. et Vaux, D.L. (2001). Direct inhibition of caspase 3 is dispensable for the anti-apoptotic activity of XIAP. *Embo J* 20, 3114-3123.
- Singer, M. et Berg, P. (1991). *Genes and genomes: a changing perspective*, Mill Valley: University Science Books).
- Slee, E.A., Harte, M.T., Kluck, R.M., Wolf, B.B., Casiano, C.A., Newmeyer, D.D., Wang, H.G., Reed, J.C., Nicholson, D.W., Alnemri, E.S., Green, D.R. et Martin, S.J. (1999). Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* 144, 281-292.
- Soengas, M.S., Capodici, P., Polsky, D., Mora, J., Esteller, M., Opitz-Araya, X., McCombie, R., Herman, J.G., Gerald, W.L., Lazebnik, Y.A., Cordon-Cardo, C. et Lowe, S.W. (2001). Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* 409, 207-211.
- Solary, E., Bettaieb, A., Dubrez-Daloz, L. et Garrido, C. (2002). Alteration of cell death related genes in human diseases. *Med Sci (Paris)* 18.
- Soung, Y.H., Lee, J.W., Kim, S.Y., Jang, J., Park, Y.G., Park, W.S., Nam, S.W., Lee, J.Y., Yoo, N.J. et Lee, S.H. (2005). CASPASE-8 gene is inactivated by somatic mutations in gastric carcinomas. *Cancer Res* 65, 815-821.
- Sperandio, S., de Belle, I. et Bredesen, D.E. (2000). An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14376-14381.
- Spiess, C., Beil, A. et Ehrmann, M. (1999). A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell* 97, 339-347.

- Srinivasula, S.M., Hegde, R., Saleh, A., Datta, P., Shiozaki, E., Chai, J., Lee, R.A., Robbins, P.D., Fernandes-Alnemri, T., Shi, Y. et Alnemri, E.S. (2001). A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* 410, 112-116.
- Stone, S., Jiang, P., Dayananth, P., Tavtigian, S.V., Katcher, H., Parry, D., Peters, G. et Kamb, A. (1995). Complex structure and regulation of the P16 (MTS1) locus. *Cancer Res* 55, 2988-2994.
- Strasser, A., Harris, A.W., Bath, M.L. et Cory, S. (1990). Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature* 348, 331-333.
- Stroh, C. et Schulze-Osthoff, K. (1998). Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates. *Cell Death Differ* 5, 997-1000.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M. et Kroemer, G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-446.
- Suzuki, K., Imajoh, S., Emori, Y., Kawasaki, H., Minami, Y. et Ohno, S. (1987). Calcium-activated neutral protease and its endogenous inhibitor. Activation at the cell membrane and biological function. *FEBS Lett* 220, 271-277.
- Suzuki, M., Youle, R.J. et Tjandra, N. (2000). Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* 103, 645-654.
- Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K. et Takahashi, R. (2001). A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* 8, 613-621.
- Szabadkai, G., Simoni, A.M., Chami, M., Wieckowski, M.R., Youle, R.J. et Rizzuto, R. (2004). Drp-1-dependent division of the mitochondrial network blocks intraorganellar Ca²⁺ waves and protects against Ca²⁺-mediated apoptosis. *Mol Cell* 16, 59-68.
- Takita, J., Yang, H.W., Chen, Y.Y., Hanada, R., Yamamoto, K., Teitz, T., Kidd, V. et Hayashi, Y. (2001). Allelic imbalance on chromosome 2q and alterations of the caspase 8 gene in neuroblastoma. *Oncogene* 20, 4424-4432.
- Tan, S., Sagara, Y., Liu, Y., Maher, P. et Schubert, D. (1998). The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death. *J Cell Biol* 141, 1423-1432.
- Tata, J.R. (1966). Requirement for RNA and protein synthesis for induced regression of the tadpole tail in organ culture. *Dev Biol* 13, 77-94.
- Teitz, T., Wei, T., Valentine, M.B., Vanin, E.F., Grenet, J., Valentine, V.A., Behm, F.G., Look, A.T., Lahti, J.M. et Kidd, V.J. (2000). Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med* 6, 529-535.
- Tewari, M., Telford, W.G., Miller, R.A. et Dixit, V.M. (1995). CrmA, a poxvirus-encoded serpin, inhibits cytotoxic T-lymphocyte-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 270, 22705-22708.
- Thornberry, N.A. et Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316.
- Tiwari, B.S., Belenghi, B. et Levine, A. (2002). Oxidative stress increased respiration and generation of reactive oxygen species, resulting in ATP depletion, opening of mitochondrial permeability transition, and programmed cell death. *Plant Physiol* 128, 1271-1281.
- Toyota, H., Yanase, N., Yoshimoto, T., Moriyama, M., Sudo, T. et Mizuguchi, J. (2003). Calpain-induced Bax-cleavage product is a more potent inducer of apoptotic cell death than wild-type Bax. *Cancer Lett* 189, 221-230.
- Trump, B.F., Berezsky, I.K., Chang, S.H. et Phelps, P.C. (1997). The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicol Pathol* 25, 82-88.
- Tsujimoto, Y. (1989). Stress-resistance conferred by high level of bcl-2 alpha protein in human B lymphoblastoid cell. *Oncogene* 4, 1331-1336.

- Tsujimoto, Y. (1998). Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes Cells* 3, 697-707.
- Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E. et Croce, C.M. (1985a). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228, 1440-1443.
- Tsujimoto, Y., Jaffe, E., Cossman, J., Gorham, J., Nowell, P.C. et Croce, C.M. (1985b). Clustering of breakpoints on chromosome 11 in human B-cell neoplasms with the t(11;14) chromosome translocation. *Nature* 315, 340-343.
- Tsujimoto, Y., Yunis, J., Onorato-Showe, L., Erikson, J., Nowell, P.C. et Croce, C.M. (1984). Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation. *Science* 224, 1403-1406.
- Uren, A.G., O'Rourke, K., Aravind, L.A., Pisabarro, M.T., Seshagiri, S., Koonin, E.V. et Dixit, V.M. (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, 961-967.
- Uren, A.G., Pakusch, M., Hawkins, C.J., Puls, K.L. et Vaux, D.L. (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, 4974-4978.
- Van Cruchten, S. et Van Den Broeck, W. (2002). Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol* 31, 214-223.
- Vaux, D.L., Cory, S. et Adams, J.M. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335, 440-442.
- Vaux, D.L. et Korsmeyer, S.J. (1999). Cell death in development. *Cell* 96, 245-254.
- Vaux, D.L. et Strasser, A. (1996). The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2239-2244.
- Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J. et Vaux, D.L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102, 43-53.
- Verhagen, A.M., Silke, J., Ekert, P.G., Pakusch, M., Kaufmann, H., Connolly, L.M., Day, C.L., Tikoo, A., Burke, R., Wrobel, C., Moritz, R.L., Simpson, R.J. et Vaux, D.L. (2002). HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem* 277, 445-454. Epub 2001 Oct 2016.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. et Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184, 39-51.
- Vogt. (1842). Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkroete (Alytes obstetricans). *Jent und Gassmann, Solothurn*.
- von Ahsen, O., Renken, C., Perkins, G., Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E. et Newmeyer, D.D. (2000). Preservation of mitochondrial structure and function after Bid- or Bax-mediated cytochrome c release. *J Cell Biol* 150, 1027-1036.
- Walker, N.P., Talanian, R.V., Brady, K.D., Dang, L.C., Bump, N.J., Ferenz, C.R., Franklin, S., Ghayur, T., Hackett, M.C., Hammill, L.D. et al. (1994). Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell* 78, 343-352.
- Wang, H.G., Pathan, N., Ethell, I.M., Krajewski, S., Yamaguchi, Y., Shibasaki, F., McKeon, F., Bobo, T., Franke, T.F. et Reed, J.C. (1999). Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* 284, 339-343.
- Wang, K.K. (2000). Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci* 23, 20-26.

- Wang, X. (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 15, 2922-2933.
- Wang, X., Yang, C., Chai, J., Shi, Y. et Xue, D. (2002). Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 298, 1587-1592.
- Waterhouse, N.J., Ricci, J.E. et Green, D.R. (2002). And all of a sudden it's over: mitochondrial outer-membrane permeabilization in apoptosis. *Biochimie* 84, 113-121.
- Wei, M.C., Lindsten, T., Mootha, V.K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., Thompson, C.B. et Korsmeyer, S.J. (2000). tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev* 14, 2060-2071.
- Weil, M., Jacobson, M.D. et Raff, M.C. (1998). Are caspases involved in the death of cells with a transcriptionally inactive nucleus? Sperm and chicken erythrocytes. *J Cell Sci* 111, 2707-2715.
- Widmann, C., Gerwins, P., Johnson, N.L., Jarpe, M.B. et Johnson, G.L. (1998). MEK kinase 1, a substrate for DEVD-directed caspases, is involved in genotoxin-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 18, 2416-2429.
- Williams, M.S. et Henkart, P.A. (1994). Apoptotic cell death induced by intracellular proteolysis. *J Immunol* 153, 4247-4255.
- Wilson, K.P., Black, J.A., Thomson, J.A., Kim, E.E., Griffith, J.P., Navia, M.A., Murcko, M.A., Chambers, S.P., Aldape, R.A., Raybuck, S.A. et al. (1994). Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature* 370, 270-275.
- Wolf, B.B. et Green, D.R. (1999). Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem* 274, 20049-20052.
- Wolter, K.G., Hsu, Y.T., Smith, C.L., Nechushtan, A., Xi, X.G. et Youle, R.J. (1997). Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 139, 1281-1292.
- Wood, D.E. et Newcomb, E.W. (1999). Caspase-dependent activation of calpain during drug-induced apoptosis. *J Biol Chem* 274, 8309-8315.
- Wood, W., Turmaine, M., Weber, R., Camp, V., Maki, R.A., McKercher, S.R. et Martin, P. (2000). Mesenchymal cells engulf and clear apoptotic footplate cells in macrophageless PU.1 null mouse embryos. *Development* 127, 5245-5252.
- Wu, Y.C., Stanfield, G.M. et Horvitz, H.R. (2000). NUC-1, a *Caenorhabditis elegans* DNase II homolog, functions in an intermediate step of DNA degradation during apoptosis. *Genes Dev* 14, 536-548.
- Wyllie, A.H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284, 555-556.
- Wyllie, A.H. et Golstein, P. (2001). More than one way to go. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11-13.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F. et Currie, A.R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68, 251-306.
- Wyllie, A.H., Morris, R.G., Smith, A.L. et Dunlop, D. (1984). Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* 142, 67-77.
- Xiang, J., Chao, D.T. et Korsmeyer, S.J. (1996). BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14559-14563.
- Yanagisawa, H., Miyashita, T., Nakano, Y. et Yamamoto, D. (2003). HSpin1, a transmembrane protein interacting with Bcl-2/Bcl-xL, induces a caspase-independent autophagic cell death. *Cell Death Differ* 10, 798-807.
- Yang, E. et Korsmeyer, S.J. (1996). Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* 88, 386-401.
- Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, J., Peng, T.I., Jones, D.P. et Wang, X. (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275, 1129-1132.

- Yang, Q.H., Church-Hajduk, R., Ren, J., Newton, M.L. et Du, C. (2003). Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis. *Genes Dev* 17, 1487-1496.
- Yang, R.Y., Hsu, D.K. et Liu, F.T. (1996). Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6737-6742.
- Ye, H., Cande, C., Stephanou, N.C., Jiang, S., Gurbuxani, S., Larochette, N., Daugas, E., Garrido, C., Kroemer, G. et Wu, H. (2002). DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat Struct Biol* 9, 680-684.
- Yeh, W.C., Hakem, R., Woo, M. et Mak, T.W. (1999). Gene targeting in the analysis of mammalian apoptosis and TNF receptor superfamily signaling. *Immunol Rev* 169, 283-302.
- Yin, X.M., Oltvai, Z.N. et Korsmeyer, S.J. (1994). BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 369, 321-323.
- Yoshida, M. (2001). Multiple viral strategies of HTLV-1 for dysregulation of cell growth control. *Annu Rev Immunol* 19, 475-496.
- Youle, R.J. (2005). Morphology of Mitochondria During Apoptosis: Worms- to-Beetles in Worms. *Dev Cell* 8, 298-299.
- Yu, F., Finley, R.L., Jr., Raz, A. et Kim, H.R. (2002). Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation. *J Biol Chem* 277, 15819-15827. Epub 12002 Feb 15811.
- Yuan, J. et Yankner, B.A. (2000). Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407, 802-809.
- Zamzami, N. et Kroemer, G. (2001). The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 67-71.
- Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Zanin, C., Vayssiere, J.L., Petit, P.X. et Kroemer, G. (1995). Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *J Exp Med* 181, 1661-1672.
- Zha, J., Harada, H., Osipov, K., Jockel, J., Waksman, G. et Korsmeyer, S.J. (1997). BH3 domain of BAD is required for heterodimerization with BCL-XL and pro-apoptotic activity. *J Biol Chem* 272, 24101-24104.
- Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J. et Korsmeyer, S.J. (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 87, 619-628.
- Zhou, P., Chou, J., Olea, R.S., Yuan, J. et Wagner, G. (1999). Solution structure of Apaf-1 CARD and its interaction with caspase-9 CARD: a structural basis for specific adaptor/caspase interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11265-11270.
- Zhou, Q., Snipas, S., Orth, K., Muzio, M., Dixit, V.M. et Salvesen, G.S. (1997). Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases. *J Biol Chem* 272, 7797-7800.
- Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A. et 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, 405-413.
- Zwaal, R.F. et Schroit, A.J. (1997). Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 89, 1121-1132.

RESUME .

L'expression de **galig**, gène interne au gène de la *galectine-3*, conduit à la mort des cellules. L'ARNm de *galig* produit deux protéines : **la mitogaligine** et **la cytogaligine**. La mitogaligine induit la libération cytosolique d'un effecteur de mort contenu dans l'espace intermembranaire mitochondrial, **le cytochrome c**. La co-expression de Bcl-X_L, mais pas de Bcl-2, protéines anti-apoptotiques réduit significativement cet effet. Des études de relation structure/fonction ont permis de délimiter le signal d'adressage mitochondrial en position interne dans la mitogaligine, des anticorps contre la cytogaligine ont été développés, des sites d'initiation de traduction de la cytogaligine ont été étudiés. Enfin, un test de quantification des ARNm a été mis au point par RT-PCR quantitative afin d'initier l'étude de l'expression de *galig* *in vivo* dans des tissus humains.