



HAL
open science

Aspects moléculaires et cellulaires de l'activité cytotoxique de la mitogaligine, une protéine inductrice de la mort cellulaire.

Patrick Gonzalez

► **To cite this version:**

Patrick Gonzalez. Aspects moléculaires et cellulaires de l'activité cytotoxique de la mitogaligine, une protéine inductrice de la mort cellulaire.. domain_other. Université d'Orléans, 2007. Français. NNT : . tel-00387522

HAL Id: tel-00387522

<https://theses.hal.science/tel-00387522>

Submitted on 25 May 2009

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 Moléculaire et Cellulaire
par
Patrick GONZALEZ

**Aspects moléculaires et cellulaires de l'activité
cytotoxique de la mitogaligine, une protéine
inductrice de la mort cellulaire.**

Soutenue le 13 Juillet 2007

Membres du jury :

M. Bernard MIGNOTTE	Rapporteur	<u>Professeur à l'Université de Versailles Saint-Quentin</u>
M. Philippe JUIN	Rapporteur	<u>Chargé de recherche INSERM</u>
M. François ÉRARD	Examineur	<u>Professeur à l'Université d'Orléans</u>
M. Guillaume BOSSIS	Examineur	<u>Chargé de recherche CNRS</u>
M. Alain LEGRAND	Directeur de thèse	<u>Professeur à l'Université d'Orléans</u>

Table des matières

Table des matières	1
Abréviations	5
Introduction	7
I. Galig, un gène interne au gène de la galectine-3	8
II. La mitogaligine dans l'activité cytotoxique de galig.	9
Généralités	12
I. Un contrôle social des cellules : la mort renforce les liens	13
I.1. Une origine lointaine	13
I.2. Mort cellulaire et homéostasie: des suicides individuels ou collectifs au service des organismes pluricellulaires	14
II. Les différents « visages » de la mort cellulaire	16
II.1. La nécrose	16
II.2. La mort cellulaire autophagique	19
II.3. L'apoptose	20
III. Mécanismes moléculaires de l'apoptose	21
III.1. Les caspases, des protéines spécialisées dans l'élimination sans bavures	21
a) Une activation complexe	22
b) Les IAP contre les faux départs	24
c) Rôle des caspases dans l'apoptose	24
III.2. Des récepteurs impliqués dans la survie et dans la mort cellulaire	25
III.3. La voie apoptotique intrinsèque mitochondriale	27
a) Des facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux	27
b) Régulation de la perméabilité de la membrane mitochondriale par le PTP	30
c) Régulation de la perméabilité des mitochondries indépendante du PTP : des membres de la famille Bcl-2 font leur percée.	31
d) Les protéines de la famille Bcl-2 : une discussion de famille autour de la mort cellulaire	34
IV. Des morts cellulaires programmées en interaction	36
V. La mort cellulaire un obstacle contre le cancer	39
V.1. La mort cellulaire, une barrière contre l'instabilité génomique	41
V.2. Prolifération autonome des cellules cancéreuses	43
a) Des oncogènes suppresseurs de tumeurs	44
b) Rôle des protéines de la famille Bcl-2 dans le contrôle du cycle cellulaire	45
V.3. Adaptation aux stress métaboliques et hypoxiques associés à l'oncogénèse: « autophagie et nécrose au menu »	46

V.4. Réplication illimitée : « Un immortel n'est invincible que s'il apprend à protéger sa tête »	48
V.5. Propriété métastatique des cancers : faire d'un itinéraire parsemé d'embûches, un voyage sans histoire	50
a) Détachement des cellules cancéreuses de leur matrice et des cellules avoisinantes	50
b) Intravasation	52
VI. Thérapies anti-cancéreuses basées sur la mort cellulaire	53
VI.1. Implication de la mort cellulaire dans l'efficacité des thérapies conventionnelles.....	53
VI.2. De nouvelles stratégies impliquant les mécanismes de la mort cellulaire	54
<i>Première partie : Caractérisation des effets de la mitogaligine sur des membranes lipidiques</i>	58
I. Introduction	58
II. Matériel et méthodes.....	58
II.1. Synthèse peptidique	58
II.2. Préparation de liposomes	59
II.3. Dosage des phospholipides	59
II.4. Test de perméabilisation des liposomes.....	60
a) Encapsulation d'inuline tritiée dans les liposomes	60
b) Test de fuite	60
II.5. Titration des peptides dérivés de la mitogaligine par des liposomes par spectroscopie de fluorescence	61
II.6. Extinction de fluorescence par l'acrylamide.....	63
II.7. Turbidimétrie	63
II.8. Agrégation mitochondriale	64
II.9. Transformation de levures	65
III. Résultats	66
III.1. Les peptides dérivés de la mitogaligine avec des membranes lipidiques	66
a) Interaction avec des membranes contenant de la cardiolipine	67
b) Une interaction dépendante de contributions électrostatiques.....	68
c) Evaluation de l'insertion membranaire des tryptophanes	69
d) Interaction du peptide MG 31-53 avec différents phospholipides anioniques.....	71
III.2. Les peptides dérivés de la mitogaligine déstabilisent des membranes contenant de la cardiolipine ...	72
a) Perméabilisation de liposomes.....	72
b) Agrégation des liposomes.....	73
c) Agrégation de mitochondries isolées.....	74
III.3. Adressage de la mitogaligine dans des levures déficientes en cardiolipine.....	76
IV. Publication.....	77

Deuxième partie : Caractérisation de l'activité cytotoxique de la mitogaligine	87
I. Introduction	87
II. Matériel et méthodes.....	87
II.1. Construction de plasmides codants pour des protéines de fusion	87
a) Condition des PCR	88
b) Digestion des sites de restriction et ligation des inserts dans les plasmides	90
c) Transformation des bactéries	90
d) Amplification des plasmides	90
II.2. Culture cellulaire.....	91
II.3. Transfections.....	91
II.4. Détection de la mitogaligine par western blotting	91
II.5. Détection de la mitogaligine par immunofluorescence.....	92
II.6. Déplétion cellulaire en ATP.....	92
II.7. Gel retard	92
II.8. Tests de cytotoxicité	93
a) Quantification de la mortalité cellulaire	93
b) Inhibition des caspases	93
c) Détermination de l'état de dégradation de l'ADN	93
d) Evaluation de l'activité de la caspase 3	94
e) Relargage de cytochrome c.....	94
f) Détection du potentiel transmembranaire mitochondrial.....	94
g) Détection de Bax	95
III. Résultats	95
III.1 Quantification de la cytotoxicité de la mitogaligine	95
III.2 Stabilité de la mitogaligine	97
III.3 Caractérisation de l'adressage nucléaire de la mitogaligine	98
a) Influence des protéines fluorescentes fusionnées à la mitogaligine sur son adressage.....	98
b) Un transport actif vers le noyau.....	100
c) Interaction des peptides dérivés de la mitogaligine avec de l'ADN	101
III.4 La forme native de la mitogaligine est adressée aux mitochondries.....	101
III.5 Caractérisation de la mort cellulaire induite par la mitogaligine	103
a) Des caractéristiques morphologiques dépendantes de l'activation des caspases	103
b) Une altération de la chromatine.....	104
c) Activation des caspases	107
d) La mitogaligine induit une fuite de cytochrome c	108
e) Une perte tardive du potentiel transmembranaire mitochondrial.....	111
f) Activation de Bax au cours de l'apoptose induite par la mitogaligine	113
Discussion et perspectives	115
I. La mitogaligine peut déstabiliser la membrane mitochondriale par son interaction avec la cardiolipine	115
I.1. Une spécificité large pour les phospholipides anioniques, et une préférence pour la cardiolipine	115
I.2. La cardiolipine participe t'elle à l'adressage mitochondrial de la mitogaligine <i>in vivo</i> ?.....	117
I.3. Déstabilisation de membranes phospholipidiques contenant de la cardiolipine par les peptides dérivés de la mitogaligine	118

II. La mitogaligine induit-elle une apoptose d'origine nucléaire ou une apoptose initiée à partir des mitochondries?	119
II.1. Une forme nucléaire de la mitogaligine	119
II.2. Deux cibles et une protéine cytotoxique	120
a) Des évènements nucléaires	122
b) Des évènements mitochondriaux	123
III. Une régulation de l'activité cytotoxique de la mitogaligine par son adressage.....	125
<i>Bibliographie</i>	128

Abréviations

ADN :	Acide désoxyribonucléique	HSP :	Heat shock protein
ADNc :	ADN complémentaire	Htra2 :	High temperature requirement a2
AIF :	Apoptosis inducing factor	IAP :	Inhibitor of apoptosis protein
ANT :	Adenine nucleotide translocator	IGF-R :	Insulin growth factor receptor
Apaf-1 :	Apoptotic protease activating factor-1	IRES :	Internal ribosome entry site
ARC :	Apoptosis repressor with a CARD domain	kDa :	kilo-Dalton
ARNm :	Acide ribonucléique messenger	LB :	Luria-Bertani
ATM :	Ataxia telangectasia mutated	LGALS3 :	Locus du gène de la galectine-3
ATP :	Adénosine tri-phosphate	MG :	Mitogaligine
Bax :	Bcl-2 antagonist X	MSH2 :	MutS Homologue-2
Bak :	Bcl-2 antagonist Killer	mTOR :	Mammalian target of rapamycin
Bcl-2 :	B cell lymphoma 2	NAD :	Nicotinamide adenine dinucleotide
Bcl-XL :	Bcl-2 homologue X Long	NGF-R :	Nervous growth factor receptor
BH :	Bcl-2 homology region	ORF :	Open reading frame
BIR :	Baculovirus IAP repeat	PA :	Phosphatidic acid
CAD :	Caspase-activated DNase	PARP :	Poly ADP-ribosyl polymerase
CARD :	Caspase recruitment domain	PBS :	Phosphate buffer saline
CDL :	Cardiolipin	PC :	Phosphatidylcholine
CDP-DAG :	Cytidine diphosphate diacylglycerol	PCR :	Polymerase chain reaction
Chol :	Cholestérol	PG :	Phosphatidylglycerol
CMH :	Complexe majeur d'histocompatibilité	PI :	Phosphatidylinositol
DAPK :	Death associated protein kinase	PI3K :	Phosphoinositide-3-kinase
Diablo :	Direct IAP binding protein with low pI	PIDD :	P53 induced protein with a death domain
dUTP :	déoxyuridine triPhosphate	PMSF :	Phényl méthane sulfonyl fluorure
DD :	Death domain	PS :	Phosphatidylsérine
DED :	Death effector domain	PTEN :	Phosphatase and tensin homolog
DISC :	Death inducing signalling complex	PTP :	Permeability transition pore
DTT :	Dithiothrietol	PUMA :	P53 upregulated modulator of apoptosis
EDTA :	Ethylène diamine tetra acetate	RAIDD :	RIP-associated ICH-1/CED-3 homologous protein with a death domain.
FADD :	Fas associated death domain	RIP :	Ribosome inactivating protein
FAK :	Focal adhesion kinase	SIDA :	Syndrome d'immunodeficiency acquise
FITC :	Fluorescéine isothioCyanate	Smac :	Second mitochondria-derived activator of caspases
Galig :	Galectin-3 internal gene		
GFP :	Green fluorescent protein		
HER :	Human epidermal growth factor receptor-2		

TMRM : Tetra-methyl rhodamine methyl ester

TRAIL : TNF-related apoptosis-inducing ligand receptors

Tris-HCl : Tris-HCl(hydroxyméthyl)-amino-méthane

TUNEL : Tdt mediated dUTP Nick-End Labeling
terminal

VDAC : Voltage dependent anionic channel

zVAD-fmk : Carbobenzoxy-V(val)-A(ala)-D(asp)-
fluoromethylketon

zVDVAD-fmk : Carbobenzoxy- V(val)-D(asp)-V(val)-
A(ala)-D(asp)-fluoromethylketon

Introduction

I. Galig, un gène interne au gène de la galectine-3

En rupture avec le paradigme « d'un gène pour une protéine », les études de l'expression génique chez les eucaryotes révèlent dans certains cas, une complexité habituellement caractéristique des génomes procaryotes ou viraux. En effet, plusieurs ARNm peuvent être transcrits à partir d'un même gène, et plusieurs protéines peuvent être traduites à partir du même ARNm. Ces variations impliquent des phénomènes employés par les procaryotes et les virus, tels que l'épissage alternatif, ou encore l'utilisation de sites d'entrée interne du ribosome (IRES) (Huez et al., 1998; Whitman et al., 2000). Un niveau supplémentaire de complexité est ajouté par la découverte de plusieurs gènes différents localisés dans un même locus. Cette structure complexe est illustrée par le locus *INK4a* qui code la protéine P16^{INK4a} (Stone et al., 1995). Un second promoteur, présent à l'intérieur de ce locus, permet la production d'un second ARNm traduit dans une phase de lecture différente de celle employée pour P16^{INK4a}. La protéine P19ARF est traduite à partir de cet ARNm (Quelle et al., 1995). Bien que ces protéines soient différentes, il est intéressant de noter qu'elles participent toutes deux à la régulation du cycle cellulaire, ce qui suggère que l'information compactée dans ce locus est employée à fonctions similaires. Plus récemment, *galig* (*galectin-3 internal gene*) a été identifié dans le gène de la galectine-3 (*LGALS3*) (Guittaut et al., 2001). Le promoteur de *galig* est situé dans l'intron 2 du gène *LGALS3*, et deux ARNm peuvent être transcrits depuis cet intron. Ces ARNm se différencient par un épissage alternatif supplémentaire dans l'intron 2, mais possèdent dans l'exon 3, deux sites d'initiation de la traduction potentiels codants pour deux protéines différentes de la galectine-3 (figure 1). Les études préliminaires, ont permis de déterminer la localisation des deux protéines codées par les ARNm issus de *galig* (Guittaut et al., 2001). La protéine issue du premier cadre de lecture a été dénommée cytogaligine, en raison de sa localisation homogène dans le cytoplasme et le noyau des cellules. La seconde protéine est en revanche adressée aux mitochondries, et a été dénommée mitogaligine. La cytogaligine et la mitogaligine sont de petites protéines de 11 kDa, qui ne présentent aucune homologie de séquence significative avec les protéines répertoriées dans les banques de données. Bien que la fonction de ces protéines ne soit pas déterminée, l'expression transitoire de *galig* dans des cellules transfectées induit la mort cellulaire, ce qui suggère que ces protéines puissent exercer une fonction cytotoxique.

Comme nous l'avons souligné dans le cas du locus *INK4a*, l'information génétique dans ces locus complexes contenant plusieurs gènes pourrait participer à une même fonction. Il est tentant de penser qu'en raison de la fonction anti-apoptotique de la galectine-3 (Nakahara et

al., 2005), le locus *LGALS3* puisse renfermer un module impliqué dans la régulation de la mort cellulaire à la fois par l'intermédiaire de la galectine-3, de la cytogaligine et la mitogaligine.

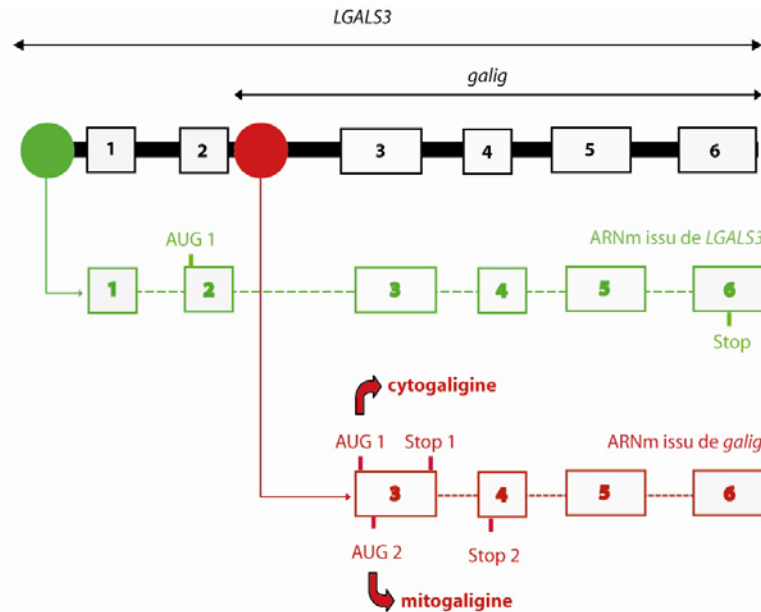


Figure 1. Structure de galig. *Galig* est un gène interne au gène de la galectine-3 (*LGALS3*) situé sur le chromosome 14. Le promoteur de *galig* (point rouge) est localisé dans l'intron 2 de *LGALS3* et permet la transcription d'un ARN messager comprenant les exons 3 à 6 de *LGALS3* (rectangles numérotés). La traduction de cet ARN messager peut s'effectuer à partir de l'exon 3 dans deux cadres de lecture différents, eux-mêmes différents du cadre de lecture de la galectine-3. *Galig* est par conséquent à l'origine de deux nouvelles protéines : la cytogaligine et la mitogaligine (Guittaut 2001).

II. La mitogaligine dans l'activité cytotoxique de *galig*.

L'expression de *galig* a été détectée dans certains tissus uniquement, ses ARNm étant plus particulièrement présents dans le cœur, les muscles, le placenta et enfin, dans les leucocytes périphériques du sang où ils sont plus abondants (Guittaut et al., 2001). Ce profil d'expression tissulaire implique par conséquent une régulation spécifique du promoteur de *galig*. Bien que les bases moléculaires de cette régulation ne soient pas déterminées, il est intéressant de remarquer qu'une augmentation de l'expression de *galig* a pu être détectée au cours de la différenciation *in vitro* de monocytes (HL60) en monocytes ou en neutrophiles (en cours d'étude au laboratoire). Le rôle de la cytogaligine et/ou de la mitogaligine dans ce processus n'est pas défini, cependant, leur implication dans la mort cellulaire observée au cours de la

différenciation des monocytes est actuellement envisagée. En effet, il a été démontré précédemment que l'expression transitoire de *galig* dans des cellules transfectées s'accompagne d'une importante cytotoxicité qui porte les marques de l'apoptose (Duneau et al., 2005). Les cellules exprimant *galig* se vésicularisent et se condensent, leur ADN est dégradé, et la fuite d'un facteur pro-apoptotique, le cytochrome c, depuis la mitochondrie est détectée. La cytotoxicité de *galig* est d'autre part inhibée par la protéine anti-apoptotique Bcl-XL, ce qui confirme l'induction de l'apoptose par la voie intrinsèque mitochondriale. La localisation mitochondriale de la mitogaligine et sa capacité à induire la fuite de cytochrome c *in vitro* et *in vivo*, suggèrent que la mitogaligine puisse être à l'origine de cette cytotoxicité.

La libération de cytochrome c depuis les mitochondries est un événement essentiel de l'apoptose, dont le contrôle dépend en grande partie des protéines de la famille Bcl-2. Certains membres de cette famille présentent des homologies structurales avec les toxines diphtériques, et perméabilisent directement la partie lipidique de la membrane mitochondriale afin d'induire l'apoptose (Garcia-Saez et al., 2004).

Bien que la mitogaligine ne présente aucune homologie avec les protéines répertoriées, elle présente des particularités retrouvées chez les peptides antimicrobiens, capables d'interagir avec des membranes lipidiques et de les perméabiliser. En effet, la mitogaligine est à la fois extrêmement cationique comme l'indique son pHi de 11,6, et très hydrophobe puisqu'elle est enrichie en tryptophanes (12%) (figure 2). Cette homologie suggère que la mitogaligine puisse également être capable d'interagir avec les membranes lipidiques. C'est pourquoi, afin de déterminer les mécanismes impliqués dans le relargage de cytochrome c depuis les mitochondries sous l'effet de la mitogaligine, ses effets sur des membranes lipidiques ont été évalués. Dans une seconde partie, la caractérisation biochimique de la mort cellulaire induite par la mitogaligine a été effectuée. Curieusement, les expériences réalisées indiquent que la mitogaligine puisse être adressée vers un compartiment différent de la mitochondrie. Ce nouvel élément suggère que l'activité cytotoxique de la mitogaligine puisse être régulée par son adressage.

Afin de considérer l'importance biologique de l'étude des protéines impliquées dans la mort cellulaire, nous débuterons par la présentation de généralités concernant les processus de mort cellulaires depuis leurs origines biologiques, jusqu'à leurs implications pathologiques et thérapeutiques en considérant leur impact sur l'homéostasie de l'organisme.

Séquence protéique de la mitogaline

MAWRMGEPACWGRGLPRGFSLWGLPRAGTPRGLSWTGTSTRRLPWSTWLSRSTCTWSLPRATQ
1 10 20 30 40 50 60

RPWGLPIFWTAKCPRSLPCHWPLWRPCWATDCAL
 70 80 90

Caractéristiques physico-chimiques de la mitogaline

Taille	11 Kda
pHi	11,6
Spécificités de séquence	Arginines 12% Tryptophanes 12% Prolines 12% Acides aminés hydroxylés 18% 6 cystéines

Figure 2. Séquence et caractéristiques de la mitogaline.

Généralités

I. Un contrôle social des cellules : la mort renforce les liens

I.1. Une origine lointaine

Les mécanismes de la mort cellulaire, à présent étudiés depuis près de quarante ans (Vaux, 2002), sont à l'origine d'un domaine de recherche extrêmement actif du fait de ses implications physiopathologiques et de ses applications thérapeutiques potentielles. Ce champ d'investigation recouvre différentes formes de morts cellulaires telles que l'apoptose, l'autophagie ou la nécrose, qui sont contrôlées génétiquement. Ces mécanismes participent à de nombreuses fonctions physiologiques. De façon très générale, la mort cellulaire est impliquée dans la régulation de la taille, et dans le maintien de l'intégrité des populations cellulaires. Ces mécanismes sont donc particulièrement importants chez les organismes pluricellulaires, en raison de la diversité des types cellulaires qui les compose. De ce point de vue, l'existence de phénomènes de mort cellulaire génétiquement programmée dans les organismes unicellulaires procaryote et eucaryote peut surprendre. En fait, ces processus semblent avoir été précocement sélectionnés et exploités afin d'assurer un « contrôle social » des populations cellulaires (Ameisen, 2002; Koonin et Aravind, 2002; Yarmolinsky, 1995). En effet, la mort cellulaire dans ces organismes permet d'ajuster la taille de la population par rapport aux ressources de leur environnement, de maintenir la stabilité génétique de l'espèce et d'assurer la survie de la population cellulaire face aux agressions d'organismes étrangers. Ainsi, chez les bactéries, l'une des stratégies identifiées implique des plasmides codant à la fois pour un poison, présentant une durée de vie longue et sécrété dans le milieu ; ainsi qu'un antidote instable qui demeure dans le cytoplasme de la bactérie (Jensen et Gerdes, 1995). Ce système assure la protection des bactéries, et le contrôle de leur environnement en provoquant l'élimination de microorganismes sensibles au poison. Il nécessite d'autre part la conservation du plasmide par les bactéries, et constitue par conséquent un moyen de stabiliser leur contenu génétique. Dans ce cas, le déclenchement de la mort cellulaire permet de supprimer « l'autre ». Cependant, la mort cellulaire peut également prendre la forme d'un « suicide altruiste ». Chez *E. coli* par exemple, la protéine Lit est responsable de l'autodestruction des cellules infectées par le phage T4 afin d'éviter la propagation de l'infection à l'ensemble de la population bactérienne (Georgiou et al., 1998).

La mort cellulaire est également exploitée de façon intrinsèque par les organismes unicellulaires, afin de réguler la taille des populations cellulaires et de l'adapter aux changements des conditions de vie de l'environnement. Lorsque les ressources du milieu diminuent, les streptomycètes ou les myxobactéries collaborent pour former des structures

ramifiées comparables à des arbres bactériens, appelées corps de fructification (figure 3). Alors que les feuilles et les fruits sont formés de cellules différenciées en spores, destinées à assurer la survie du micro-organisme, l'autodestruction d'une partie des bactéries à l'origine « du tronc et des branches de ces arbres », est nécessaire à la génération des corps de fructification (Kaiser, 1996; Wireman et Dworkin, 1977). Les mécanismes permettant de déterminer les cellules à éliminer sont mal définis, mais plusieurs indications suggèrent que la mort cellulaire est régulée par des signaux de communications intercellulaires.

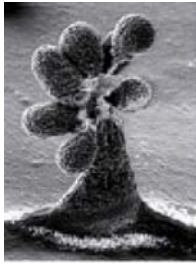


Figure 3. « Le corps de fructification », un exemple d'organisation pluricellulaire qui met en jeu la mort cellulaire chez les procaryotes.

C'est ainsi que chez les eucaryotes unicellulaires *trypanosoma cruzi* et le protozoaire cilié *tetrahymena thermophila*, la survie des cellules dépend de la densité cellulaire, ainsi que de signaux provenant de la colonie (Ameisen et al., 1995; Christensen et al., 1995). De façon contre intuitive, ces observations suggèrent que la mort cellulaire est un phénomène actif par défaut dans les organismes, qui peut être réprimé par la communication intercellulaire. Outre les avantages de l'élimination individuelle des cellules altérées, l'émergence des processus de mort cellulaire dans les organismes unicellulaires et leur développement dans les organismes pluricellulaires est donc probablement lié à leur importance dans la régulation des comportements collectifs.

I.2. Mort cellulaire et homéostasie: des suicides individuels ou collectifs au service des organismes pluricellulaires

L'émergence tardive du concept de la mort cellulaire programmée s'explique en partie par son caractère paradoxal : la construction et le fonctionnement des organismes dépendent de processus d'autodestruction (Lockshin et Zakeri, 2001).

La mort cellulaire a pourtant été observée pendant des dizaines d'années par les biologistes du développement au cours des métamorphoses des insectes, du développement embryonnaire, ou de la morphogénèse (Glucksmann, 1951). Cependant, son occurrence a longtemps été considérée comme accidentelle. Bien qu'en 1842, Vogt ait décrit une élimination prédictible des cellules aux cours du développement embryonnaire [Vogt, 1842 #205], il faut attendre 1965 pour que Lockshin et Williams proposent le terme de « mort

cellulaire programmée » (Lockshin et Williams, 1965), donnant ainsi à la mort cellulaire une implication physiologique dans le développement. L'utilisation du terme de « mort cellulaire programmée » fait référence dans ce cas au caractère prédictible de la mort cellulaire. Cette appellation prend par la suite une nouvelle dimension, avec le passage de la mort des cellules d'un phénomène inscrit précisément dans le temps, vers un mécanisme actif d'origine génétique, régulé par des facteurs environnementaux. Cette transition s'est effectuée grâce à la caractérisation morphologique et biochimique de différents types de mort cellulaire, ainsi qu'à la découverte de gènes impliqués dans la mort cellulaire (Ellis et Horvitz, 1986; Kerr et al., 1972; Tsujimoto et Croce, 1986). Tout comme chez les micro-organismes unicellulaires, la mort cellulaire, est impliquée dans le contrôle des populations cellulaires (Hengartner, 1998). Elle participe en effet à l'homéostasie des organismes par des interactions avec les voies de signalisation de prolifération, de différenciation et de survie.

Les manifestations de la mort cellulaire au cours de l'embryogénèse chez les mammifères sont les plus spectaculaires (Saunders, 1966). Au cours du développement, la destruction de structures cellulaires de taille importante par les voies de la mort cellulaire programmée permet la mise en place de nouveaux tissus. La réduction des canaux de Müller ou de Wolff au cours de la différenciation sexuelle, ou la libération des doigts par la réduction des membranes interdigitales constituent deux événements caractéristiques des implications de la mort cellulaire dans le développement embryonnaire humain (Jacobson et al., 1997; Merino et al., 1999).

La mort cellulaire est également impliquée dans la régulation du système immunitaire depuis la production de lymphocytes immunocompétents jusqu'à leur résorption en fin de réponse immunitaire (Droin et Green, 2004; Duke et Cohen, 1986). Dans le thymus, seuls les thymocytes capables d'interagir avec les molécules du CMH et ne reconnaissant pas les antigènes du soi ne sont pas éliminés par apoptose (Nossal, 1994). C'est pourquoi, le dysfonctionnement de ce mécanisme se traduit par le développement de maladies auto-immunes telles que le lupus érythémateux (Strasser et al., 1991; Watanabe-Fukunaga et al., 1992). A l'inverse, l'activation excessive des processus de mort cellulaire des globules blancs pourrait être à l'origine de l'immunodéficience caractéristique du SIDA (Ameisen et al., 1995; Ferri et al., 2000; Perfettini et al., 2005).

L'un des résultats permettant d'appréhender le rôle fondamental de la mort cellulaire dans la préservation de l'architecture des tissus et de leur spécificité cellulaire provient d'une étude réalisée par Rita Levi-Montalcini, qui démontre que la mort cellulaire, par défaut activée, doit être en permanence réprimée par des signaux favorisant la survie (Levi-

Montalcini et al., 1975). Ces signaux sont principalement issus des communications intercellulaires et de l'adhésion des cellules avec la matrice extracellulaire et les cellules avoisinantes. Par voie de conséquence, les processus de mort cellulaire sont un moyen d'imposer le « comportement social » des cellules en instaurant la dépendance des cellules aux signaux en provenance de leur micro-environnement d'origine (Raff, 1992). En opposition avec ces règles homéostatiques, les cellules cancéreuses deviennent autonomes en inhibant de façon systématique la mort cellulaire, et plus particulièrement l'apoptose (Kerr et al., 1994; Thompson, 1995; Vaux et al., 1988). L'acquisition de cette autonomie est corrélée à leur capacité de prolifération et à leur pouvoir métastatique. On notera également qu'au-delà de ces avantages, l'inhibition de la mort cellulaire permet aux cellules cancéreuses d'accumuler des mutations, ou de résister aux stress liés à la prolifération et aux conditions de vie intra-tumorales. D'autre part, le dysfonctionnement des mécanismes de mort cellulaire favorise leur résistance aux thérapies conventionnelles. Les processus de mort cellulaire programmée constituent par conséquent l'une des barrières les plus importantes opposées à l'émergence des cancers par le contrôle collectif et individuel qu'ils réalisent sur les cellules.

II. Les différents « visages » de la mort cellulaire

Kerr et Wyllie proposent en 1972, une première classification basée sur deux types de mort cellulaire (Kerr et al., 1972). L'un permet l'élimination « propre » des cellules, n'endommage pas les cellules environnantes et est appelé **apoptose**, alors que le second type de mort cellulaire induit un phénomène inflammatoire qui atteint la région située autour de la cellule détruite. Ce type de mort cellulaire est dit **nécrotique**.

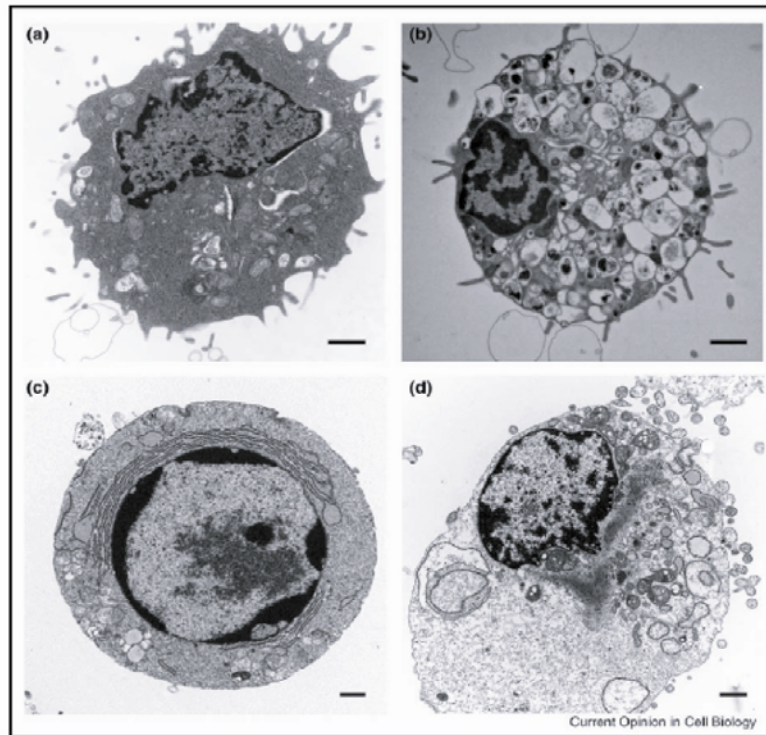
Plus récemment, un troisième processus, la mort cellulaire par **autophagie** a été intégrée à ces mécanismes. Bien que quelques variations aient été reconnues (Berg et al., 2001; Bratosin et al., 2001), ces trois types de mécanismes reflètent la plus grande majorité des morts cellulaires.

II.1. La nécrose

Cette forme de mort cellulaire se distingue principalement par son caractère inflammatoire. D'un point de vue morphologique, les cellules nécrotiques présentent souvent un gonflement de leur cytoplasme, des mitochondries élargies, et une dégradation de leur ADN (figure 4). Les calpaïnes et des cathepsines, activées au cours de la nécrose, dégradent

un grand nombre de substrats et induisent la libération du contenu cytoplasmique des cellules dans le milieu extracellulaire (Golstein et Kroemer, 2007; Liu et al., 2004; Wang, 2000).

A)



B)

Type de mort cellulaire	Caractéristiques morphologiques			Caractéristiques biochimiques
	NOYAU	MEMBRANE CYTOPLASMIQUE	CYTOPLASME	
Apoptose	<ul style="list-style-type: none"> • Chromatine condensée et fragmentée • Dégradation internucléosomique de l'ADN 	<ul style="list-style-type: none"> • Vésicularisation de la membrane plasmique 	<ul style="list-style-type: none"> • Vésicularisation du cytoplasme à l'intérieur de la membrane cytoplasmique 	<ul style="list-style-type: none"> • Activation des caspases • Requiert de l'ATP
Autophagie	<ul style="list-style-type: none"> • Condensation partielle de la chromatine • Pas de dégradation de l'ADN 	<ul style="list-style-type: none"> • Vésicularisation de la membrane plasmique 	<ul style="list-style-type: none"> • Formation de vésicules autophagiques 	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation de l'activité lysosomale
Nécrose	<ul style="list-style-type: none"> • Condensation de l'ADN • Quelques dégradations 	<ul style="list-style-type: none"> • Gonflement et rupture de la membrane plasmique 	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation de la taille des mitochondries • Dégénération des organelles • Quelques vésicules autophagiques 	<ul style="list-style-type: none"> • Perte du potentiel transmembranaire mitochondrial

Figure 4. Caractéristiques morphologiques et biochimiques des différentes formes de mort cellulaire. A) Clichés obtenus par microscopie électronique. a) cellule normale, b) cellules subissant une autophagie, c) cellule en apoptose, d) cellule nécrotique (d'après Edinger 2004). B) Tableau résumant les caractéristiques morphologiques et biochimiques des différentes formes de mort cellulaire.

Plus particulièrement, le déversement des enzymes lysosomales dans le milieu est à l'origine de l'inflammation qui accompagne ce type de mort cellulaire. En raison de ces caractéristiques, la nécrose a longtemps été considérée comme une mort cellulaire accidentelle résultant de dysfonctionnements graves de la cellule tels que la dépolarisation des mitochondries et l'arrêt de la production d'ATP (Zong et al., 2004), ou la surproduction de radicaux oxygénés (Goossens et al., 1999; Nishimura et Lemasters, 2001).

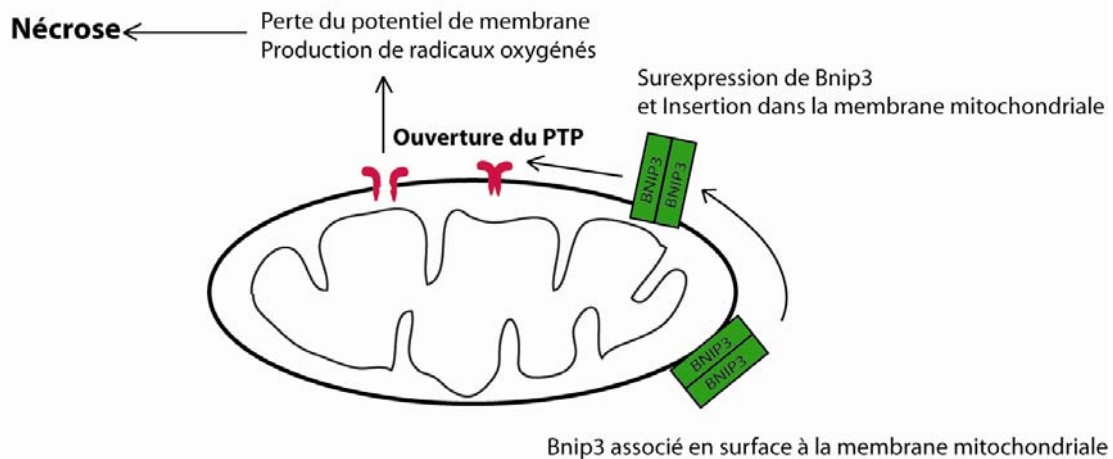


Figure 5. La surexpression de Bnip3 induit la nécrose en stimulant l'ouverture du PTP (d'après Van Velde 2000).

D'autre part, la phase d'exécution de la nécrose semble d'un point de vue biochimique plus anarchique que dans l'apoptose ou dans la mort par autophagie, puisqu'elle s'accompagne d'une dégénérescence générale et désordonnée des structures cellulaires. Il apparaît cependant que l'induction de la nécrose puisse être régulée. Par exemple, la surexpression de la protéine Bnip3, un membre de la famille Bcl-2, induit spécifiquement la nécrose en altérant le fonctionnement des mitochondries en stimulant l'ouverture d'un pore mitochondrial : le PTP (Permeability Transition Pore) (figure 5). La dépolarisation des mitochondries et l'augmentation de la production de radicaux oxygénés issue de ce dysfonctionnement sont à l'origine de la dégénérescence nécrotique des cellules (Vande Velde et al., 2000). L'expression de Bnip3 est régulée et augmente notamment au cours des réponses adaptatives à l'hypoxie. La nécrose bien qu'anarchique dans son exécution peut donc être contrôlée au niveau de son induction, ce qui justifie son caractère génétiquement programmé (Kothari et al., 2003; Vande Velde et al., 2000; Webster et al., 2005). La nécrose intervient dans des processus physiologiques et pathologiques importants. Elle est par

exemple essentielle à l'invasion des plaies par le système immunitaire et les cellules endothéliales au cours des réponses cicatricielles; mais la nécrose est également exploitée par les cancers dans la mise en place de nouveaux vaisseaux sanguins intratumoraux (Balkwill et al., 2005; Jin et al., 2007; Vakkila et Lotze, 2004).

II.2. La mort cellulaire autophagique

L'effet de l'autophagie sur les cellules est protecteur ou destructeur selon son niveau d'activation. D'une part, en participant à l'élimination, et au recyclage de composants cellulaires endommagés (Klionsky et Emr, 2000; Seglen et Bohley, 1992; Yoshimori, 2004), l'autophagie participe à l'homéostasie intracellulaire, ainsi qu'à la mise en place de réponses adaptatives aux carences en nutriments (Mizushima et al., 2004; Wang et Klionsky, 2003). L'élimination sélective et contrôlée des organelles et des protéines par autophagie débute par la formation de vésicules autour des cibles à éliminer (figure 6). Ces autophagosomes fusionnent ensuite avec des lysosomes qui apportent les enzymes nécessaires à la dégradation de leur contenu. En écartant le danger lié au fonctionnement d'organelles défectueux, et en permettant le recyclage des constituants dégradés, l'autophagie favorise la survie des cellules. Cependant, lorsque ce mécanisme est excessivement activé, il induit le mort des cellules par autophagie (Levine, 2005). Dans des conditions de stress nutritif par exemple, une réduction importante et continue des apports en nutriments résulte en une augmentation de la quantité, et de la taille des vésicules d'autophagie qui englobent et détruisent sans sélection tous les compartiments cellulaires (figure 4).

Chez les mammifères, l'autophagie est régulée par les PI3 Kinases (Petiot et al., 2000), et les DAPKinases (Inbal et al., 2002; Kimchi, 2001) à travers des systèmes de conjugaison ATG5-ATG12 et ATG8/LC3-Phosphatidyléthanolamine (PE) impliqués dans la formation des autophagosomes (Ichimura et al., 2000; Meijer et Codogno, 2004; Mizushima et al., 2001). Alors que les PI3Kinases de classe IA, stimulées par les voies de survie, inhibent l'autophagie en activant Akt et mTOR, les PI3Kinases de classe III, activées par les carences en nutriments, stimulent la formation de vacuoles d'autophagie en phosphorylant la protéine Beclin-1 (Arico et al., 2001; Petiot et al., 2000) (figure 6).

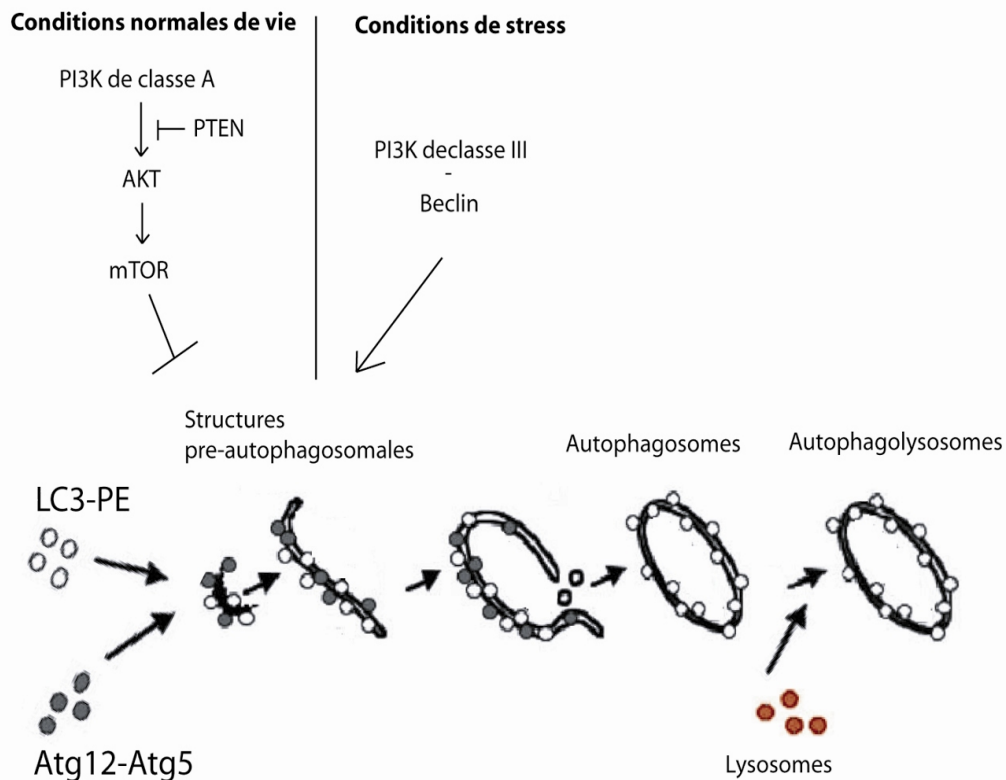


Figure 6. Régulation de la formation des vésicules d'autophagie par les PI3kinases (d'après Meijer, 2004).

II.3. L'apoptose

L'apoptose est un type de mort cellulaire actif hautement régulé, faisant intervenir un ensemble de gènes impliqués dans l'intégration d'une grande variété de signaux de stress intra- et extracellulaires de la cellule. Cette forme de mort cellulaire aujourd'hui très bien caractérisée, se distingue par la singularité de ses caractéristiques morphologiques. En effet, les cellules en apoptose dégradent leur ADN, se condensent et subissent une vésicularisation importante de leur membrane plasmique qui englobe et fragmente leur cytoplasme (Hengartner, 2001) (figure 4). La formation de ces corps apoptotiques en empêchant le relargage du contenu cytoplasmique des cellules, participe au caractère non inflammatoire de l'apoptose.

L'apoptose peut être induite par une voie intrinsèque sensible à de très nombreux signaux de stress intracellulaires (dommages à l'ADN, prolifération incontrôlée) ou de façon extrinsèque par la stimulation de récepteurs impliqués dans la mort cellulaire (Adams, 2003). Les mitochondries occupent une place centrale dans la signalisation de la plupart des morts cellulaires par apoptose (Desagher et Martinou, 2000; Green et Reed, 1998), l'intégration de

multiples signaux de stress conduit en effet à la modulation de la perméabilité de la membrane externe des mitochondries et à la libération de facteurs pro-apoptotiques contenus par les mitochondries vers le cytoplasme. Cet évènement est essentiel à l'activation des protéases spécifiques de l'apoptose, les caspases, et de nucléases impliquées dans le démantèlement des cellules (Samali et al., 1999).

III. Mécanismes moléculaires de l'apoptose

III.1. Les caspases, des protéines spécialisées dans l'élimination sans bavures

Le démantèlement de la cellule au cours de l'apoptose résulte de l'activation d'une famille de protéases spécifiques, les caspases (Cysteine-dependent aspartate specific proteases). Ces protéases, retrouvées à travers les organismes procaryotes et eucaryotes unicellulaires (Arnoult et al., 2002), sont particulièrement bien représentées chez les mammifères qui produisent 13 caspases différentes (Lamkanfi et al., 2002). La présence de ces protéases dans ces différents organismes suggère l'importance de leurs fonctions, et porte l'indication d'une élaboration précoce de la mort cellulaire (Salvesen et Dixit, 1997).

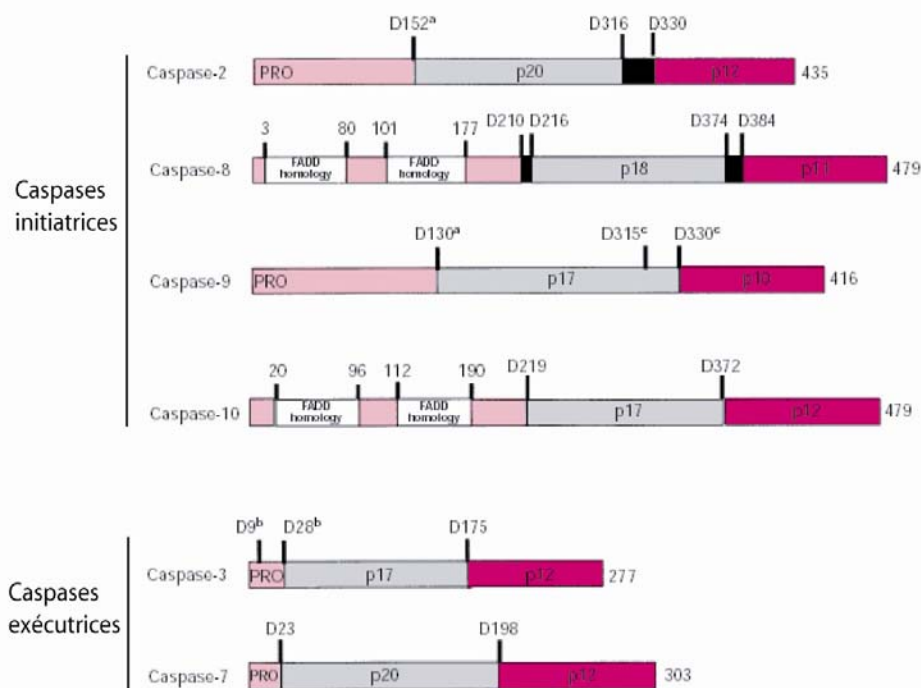


Figure 7. Classification et structure des caspases impliquées dans l'apoptose. la structure générale des caspases comprend un pro-domaine (rose clair), une grande sous-unité (gris) et une petite sous-unité (rose foncé) (d'après Cohen, 1997).

Bien que les protéases de cette famille présentent d'importantes homologies de séquence et de structure entre elles (figure 7), ainsi qu'une spécificité commune vis-à-vis des aspartes, les caspases présentent des affinités variables selon les sites consensus de clivage des substrats (Nicholson et Thornberry, 1997). Ces différences indiquent par conséquent que l'activité de chaque caspase dans l'apoptose n'est pas équivalente. On distingue effectivement parmi les caspases, des caspases initiatrices de l'apoptose (caspase 2, 8, 9, 10) qui participent à l'intégration des signaux de stress, et des caspases exécutrices (caspases 3 et 7), directement impliquées dans la destruction cellulaire (Cohen, 1997). D'autre part, chez les mammifères, les caspases 1, 4, 5, 6, 11, 12 et 13 ne participent pas à l'apoptose, mais jouent des rôles essentiels dans la différenciation et la prolifération cellulaire chez les mammifères (Elkon, 1999; Kerrigan et al., 2004; Zermati et al., 2001; Zeuner et al., 1999).

a) Une activation complexe

Les caspases sont présentes de façon constitutive dans les cellules, sous la forme de pro-caspases inactives comprenant un pro-domaine inhibiteur (figure 7). Leur activation s'effectue en cascade, depuis les caspases initiatrices vers les caspases exécutrices. Elle débute par l'activation des caspases initiatrices à l'intérieur de complexes multiprotéiques impliqués dans la transduction de signaux de stress. Dans ces complexes, les caspases initiatrices subissent un ensemble de changements conformationnels et se multimérisent.

L'apoptosome est le premier complexe impliqué dans l'activation des caspases initiatrices à avoir été découvert. Il permet d'activer la caspase 9 à la suite de la libération d'un facteur pro-apoptotique mitochondrial, le cytochrome c (Li et al., 1997; Liu et al., 1996; Reed, 1997; Zou et al., 1997). Le cytochrome c cytoplasmique se lie en présence d'ATP à une protéine adaptatrice, APAF-1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1), pour former l'unité de base de l'échafaudage heptamérique qui forme l'apoptosome (figure 8). Ensuite, ce complexe recrute et concentre localement sept molécules de pro-caspase-9. Dans ces conditions, la pro-caspase 9 s'active en changeant de conformation et en se multimérisant (Acehan et al., 2002; Boatright et al., 2003; Renatus et al., 2001).

De façon similaire, la caspase-8 et la caspase-10 sont activées par le DISC, (Death-Inducing Signaling Complex), un complexe multiprotéique impliquant les récepteurs de mort cellulaire tels que le TNF-R ou CD95/FAS (Boldin et al., 1996; Martin et al., 1998; Muzio et al., 1996). En présence de leurs ligands, ces récepteurs s'oligomérisent par leur domaine de mort (DD, Death Domain), interagissent avec FADD (Fas Associated protein with Death Domain) pour former le DISC et induire l'apoptose. Ce complexe recrute plusieurs molécules

de pro-caspase 8 par le domaine DED (Death Effector Domain) de FADD (figure 8). La pro-caspase-8 est activée à l'intérieur du DISC par un mécanisme d'activation à proximité d'autres molécules de caspase 8, de façon similaire à l'activation de la caspase 9 dans l'apoptosome (Pop et al., 2007).

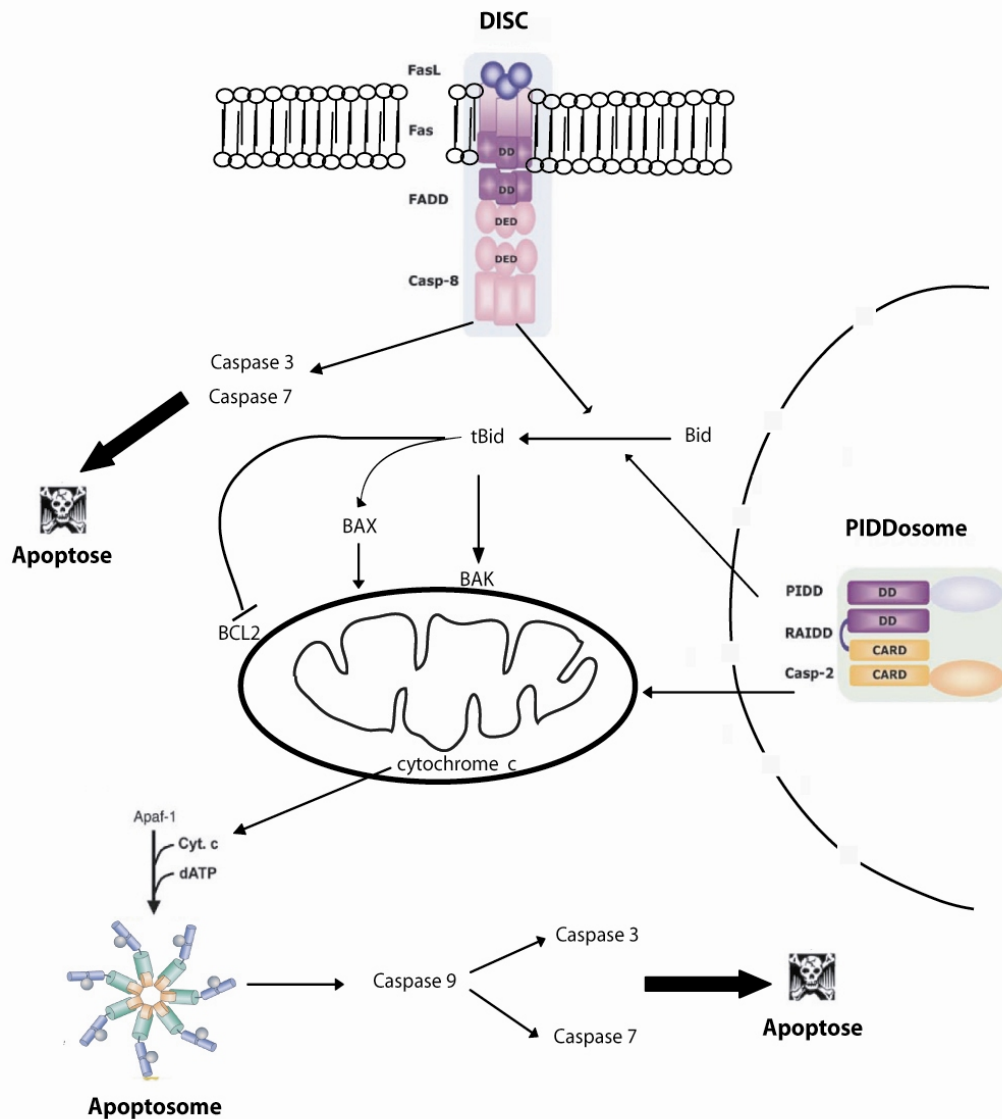


Figure 8. Activation des caspases initiatrices et des caspases exécutrices au cours de l'apoptose.

Le complexe impliqué dans l'activation de la caspase 2 a été identifié plus récemment. Il s'agit du PIDDosome, un assemblage protéique dont la formation est induite par des stress génotoxiques. Ce complexe met en jeu les protéines PIDD (p53 Induced protein with a Death Domain) et RAIDD ((RIP)-Associated ICH-1/CED-3 homologous protein with a Death Domain) (Janssens et al., 2005; Tinel et Tschopp, 2004). Le PIDDosome issu de leur

oligomérisation recrute la caspase 2 (figure 8). L'activation de la caspase 2 dans ce complexe est probablement liée à sa dimérisation.

b) Les IAP contre les faux départs

L'activité des caspases est soumise à un second mécanisme de régulation dépendant d'une famille de protéines d'abord identifiées dans les baculovirus, les IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein) (Miller, 1997). Six membres de cette famille (NIAP, C-IAP1, C-IAP2, XIAP, Livin et Bruce) sont exprimés physiologiquement de façon tissu spécifique chez l'homme (Liston et al., 1996).

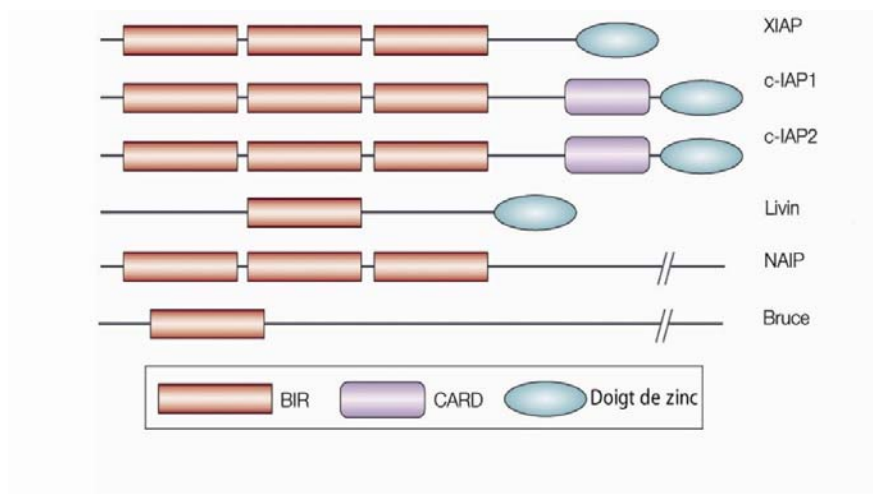


Figure 9. Structure des protéines de la famille des IAP (d'après Salvesen 2002).

L'activité anti-apoptotique de ces protéines dépend de domaines BIR (Baculoviral IAP Repeat) (figure 9), qui leur permettent d'interagir fortement avec les caspases 3, 7 et 9, et de bloquer directement l'activité des caspases (Deveraux et al., 1999; Deveraux et al., 1998; Deveraux et al., 1997; Roy et al., 1997).

Parmi ces protéines anti-apoptotiques, XIAP, C-IAP 1 et C-IAP2 se lient plus particulièrement aux formes maturées des caspases 3 et 7, ou à la caspase 9 indépendamment de son état de maturation. Les IAP constituent ainsi un moyen de contrôler strictement l'activation des caspases et l'amplification de leur activité de basale (Kroemer et Reed, 2000; Marzo et al., 1998; Salvesen et Duckett, 2002).

c) Rôle des caspases dans l'apoptose

Bien que les caspases présentent des homologies importantes entre elles, chaque caspase présente une spécificité de substrat, ce qui impose que leurs contributions

individuelles dans l'apoptose ne soient pas équivalentes. La fonction principale de la caspase 9, en tant que caspase initiatrice, repose sur la maturation protéolytique des caspases exécutrices 3 et 7. La caspase 8 peut également activer les caspases 3 et 7 cependant, son activité pro-apoptotique s'exerce également à travers l'activation de la protéine pro-apoptotique Bid. La caspase 8 génère une forme tronquée cette protéine, tBid, qui peut alors interagir avec les mitochondries, où elle inhibe la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (figure 6). Cette activité permet aux protéines pro-apoptotiques Bax et Bak pour induire la fuite de facteurs pro-apoptotiques séquestrés dans les mitochondries, tels que le cytochrome c (chapitre III.2.2). Contrairement aux caspases 8 et 9, la caspase 2 n'active pas les caspases exécutrices (Guo et al., 2002; Van de Craen et al., 1999). Son activité pro-apoptotique s'exerce en fait en activant Bid (figure 6) (Bonzon et al., 2006; Gao et al., 2005; Paroni et al., 2002). De plus, la caspase 2 participe directement à la perméabilisation de la membrane mitochondriale (Enoksson et al., 2004; Robertson et al., 2004).

Les caspases exécutrices 3 et 7, à l'origine des modifications morphologiques irréversibles et rapides qui accompagnent l'apoptose, s'attaquent notamment aux protéines structurales du cytosquelette, et plus indirectement à la chromatine en activant la Dnase CAD (Enari et al., 1998; Sakahira et al., 1998). Ces caspases participent d'autre part à la perméabilisation des mitochondries, en convertissant l'activité anti-apoptotique des protéines Bcl-2 et Bcl-XL en activité pro-apoptotique (Cheng et al., 1997; Kroemer et Reed, 2000), et en participant à l'activation de Bax (Goping et al., 1998). La perméabilisation des mitochondries et l'activation des caspases sont par conséquent deux événements interconnectés dans une boucle d'auto-amplification à l'origine de l'exécution rapide de l'apoptose.

III.2 Des récepteurs impliqués dans la survie et dans la mort cellulaire

L'apoptose est régulée par une grande variété de signaux pro- et anti-apoptotiques dont l'intégration définit « l'état de survie » des cellules. Cette balance est en grande partie influencée par le micro-environnement des cellules. En effet, un ensemble de signaux externes sont transduits par des récepteurs vers la machinerie apoptotique.

Parmi ces récepteurs, ceux de la famille du récepteur au TNF impliquent directement les voies pro-apoptotiques dans les communications intercellulaires. Le récepteur CD95/Fas est l'un de ces récepteurs. Impliqué dans l'homéostasie du système immunitaire, il est notamment exprimé sur la membrane plasmique des lymphocytes activés. L'interaction de FasL avec CD95/Fas induit la formation du DISC et l'activation de la caspase 8 (Kischkel et al., 1995).

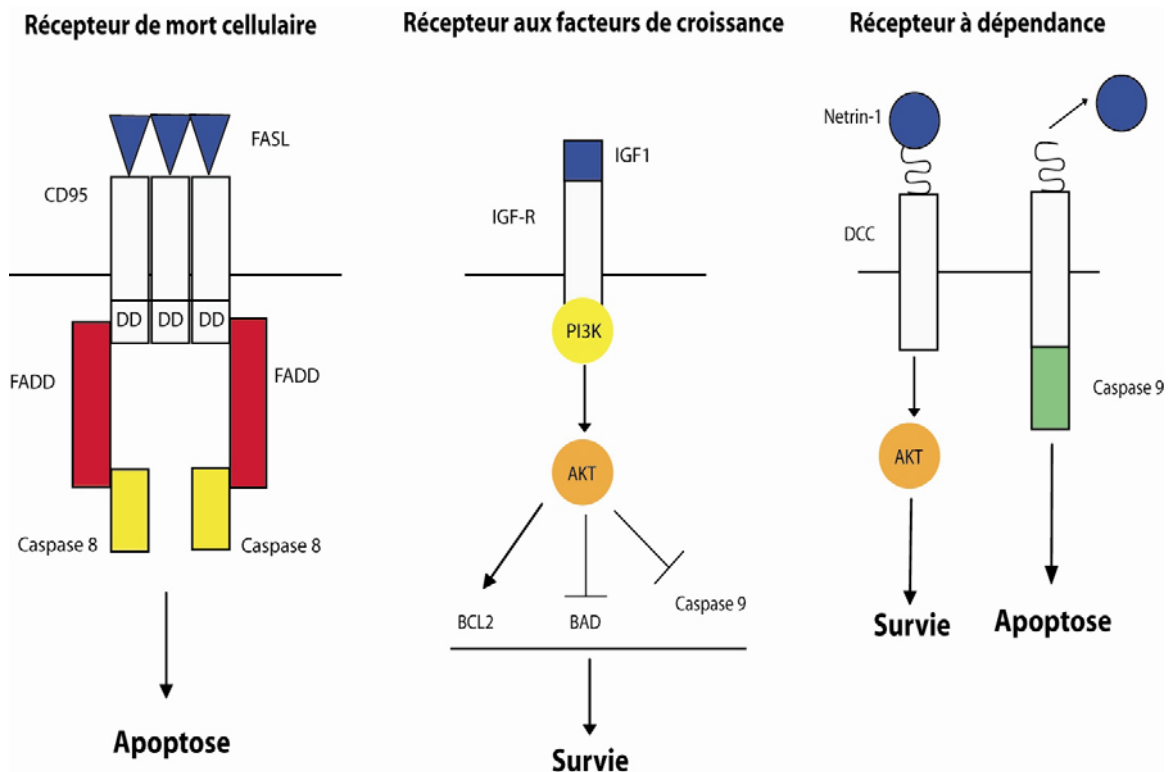


Figure 10. Régulation de l'apoptose par les récepteurs associés à la membrane plasmique.

Bien que les caspases exécutrices 3 et 7 puissent être activées par la caspase 8 lors de stimulations massives des récepteurs de mort, la transduction du signal pro-apoptotique dans le cas de stimulations plus modérées, requiert une amplification par l'intermédiaire de la protéine pro-apoptotique Bid. La forme tronquée de Bid, tBid, générée par la caspase 8, intervient au niveau des mitochondries, où elle stimule la formation de l'apoptosome en participant à la libération du cytochrome c (figure 8 et 10) (Danial et Korsmeyer, 2004). Cette voie de signalisation relie ainsi les récepteurs de mort cellulaire à l'activation des caspases exécutrices par l'intermédiaire de la voie mitochondriale (Luo et al., 1998).

A l'inverse, des récepteurs de mort cellulaire, certains récepteurs propagent dans la cellule des signaux opposés à l'apoptose. Il s'agit notamment de récepteurs aux facteurs de croissance (IGF-R, NGF-R, HER) qui, en activant des kinases pléiotropes telles que Akt, régulent à la fois le métabolisme, la prolifération et inhibent la mort cellulaire (Dennis et Kastan, 1998). Akt favorise en effet la surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2, l'inhibition de la protéine pro-apoptotique Bad et de la caspase 9 (figure 10).

Situés du point de vue de leur fonction entre les récepteurs de mort cellulaires et les récepteurs impliqués dans la survie, les récepteurs à dépendance sont à l'origine d'un troisième type de communication entre les cellules et leur micro-environnement. Cette famille de récepteurs, représentée par DCC (Deleted in Colorectal Cancer) ou UNC5H, ainsi que par certaines intégrines (Stupack, 2005), présente la particularité d'induire l'apoptose lorsque le ligand est absent, et de stimuler la survie lorsqu'ils interagissent avec ce ligand (Cirulli et Yebra, 2007; Llambi et al., 2001; Mehlen, 2005). Les mécanismes à l'origine de l'induction de l'apoptose par ces récepteurs sont mal définis. Cependant, en absence de son ligand (Netrin-1), le récepteur DCC pourrait activer les caspases 3 et 9 indépendamment de la formation de l'apoptosome (figure 10) (Forcet et al., 2001).

III.3 La voie apoptotique intrinsèque mitochondriale

Le rôle des mitochondries dans l'apoptose ne peut être réduit à l'altération de leur activité bioénergétique. En effet, l'inhibition de la production d'ATP est délétère, mais engage généralement les cellules vers un processus nécrotique inflammatoire. L'apoptose est au contraire un type de mort cellulaire contrôlé, non-inflammatoire; qui nécessite le maintien de la production d'ATP (Nicotera et Leist, 1997; Tsujimoto, 1997; Waterhouse et al., 2001). La fonction des mitochondries dans l'apoptose repose en fait sur une dualité surprenante. Ces organelles renferment en effet, dans leur espace inter-membranaire, un ensemble d'effecteurs pro-apoptotiques ubiquitaires. Ces protéines participent, à l'image du cytochrome c, au fonctionnement des mitochondries dans les conditions normales de vie et stimulent l'apoptose selon différents modes d'action lorsqu'elles sont présentes dans le cytosol (figure 11) (Saelens et al., 2004) (Brenner et Kroemer, 2000; Daugas et al., 2000). La libération de protéines pro-apoptotiques, depuis les mitochondries vers le cytoplasme, dépend de la perméabilité de la membrane mitochondriale externe, qui peut être altérée par facteurs physiques, chimiques, ou protéiques (Martinou et Green, 2001; Zamzami et Kroemer, 2001).

a) Des facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux

o Le cytochrome c

En absence de stress pro-apoptotiques, le cytochrome c est localisé dans l'espace inter-membranaire des mitochondries. Associé à la cardiolipine, un phospholipide spécifique des membranes mitochondriales, le cytochrome c participe dans ces conditions au passage des électrons dans la chaîne respiratoire du complexe III vers le complexe IV par son activité d'oxydo-réductase. Du fait de son implication dans la fonction bioénergétique des

mitochondries, le relargage du cytochrome c vers le cytoplasme pourrait compromettre la production d'ATP, et induire d'autre part, des dommages liés à l'accumulation de radicaux oxygénés dans la chaîne respiratoire (Fleury et al., 2002). Cependant, ces effets sont tardifs au cours de l'exécution de l'apoptose. La formation de l'apoptosome sous l'effet du cytochrome c est en revanche un événement précoce de cette forme de mort cellulaire (Cai et Jones, 1998). C'est pourquoi, la fonction pro-apoptotique du cytochrome c réside plus particulièrement dans sa contribution à l'activation de la caspase 9 par l'intermédiaire de l'apoptosome (figure 11) (Reed, 1997).

○ *OMI/Htra2 et Smac/Diablo* :

Bien que le relargage de cytochrome c constitue un événement essentiel de l'apoptose, il n'induit pas systématiquement la mort cellulaire. En effet, l'activité des caspases peut être inhibée après la formation de l'apoptosome par les IAP (Salvesen et Duckett, 2002). Ces inhibiteurs se lient aux caspases et doivent en être déplacés afin de permettre leur activation. Les mitochondries renferment à cet effet deux effecteurs pro-apoptotiques, OMI/Htra2 et Smac/Diablo (Du et al., 2000; Suzuki et al., 2001).

La fonction pro-apoptotique de ces protéines est portée par leur site de liaison aux domaines BIR des IAP. Les séquences de ces sites présentent d'importantes homologies avec les séquences cibles des IAP sur les caspases. Smac/Diablo et OMI/Htra2 sont ainsi en compétition avec les caspases pour les IAP. Smac/Diablo et OMI/Htra2 peuvent interagir avec les différentes IAP (XIAP, C-IAP1, C-IAP2) et présentent donc des fonctions redondantes (figure 11). Cependant, leur profil d'expression tissulaire est différent. Alors qu'OMI/Htra2 est exprimé de façon ubiquitaire, l'ARNm de Smac/Diablo est spécifiquement retrouvé dans le cœur, le foie, les reins et les testicules.

D'après la fonction de Smac / Diablo et OMI / Htra2 dans l'apoptose, il est attendu que leur libération dans le cytoplasme s'effectue en amont de l'activation des caspases. Il apparaît cependant, que le relargage de ces facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux dépende de leur activité protéolytique (Adrain et al., 2001). Smac/Diablo et OMI/Htra2 pourraient donc participer à l'amplification de l'activation des caspases.

○ *EndoG*

L'EndoG est une protéine mitochondriale impliquée dans la réplication de l'ADN mitochondrial (Cote et Ruiz-Carrillo, 1993). Au cours de l'apoptose, l'EndoG est redirigée depuis les mitochondries vers le noyau, où en présence de co-facteurs (exonucléases et

DNase I), elle génère des coupures inter-nucléosomiques de l'ADN (figure 11) (Li et al., 2001; Widlak et al., 2001). Toutefois, la délétion du gène codant pour l'EndoG n'affecte pas la dégradation de la chromatine au cours de l'apoptose, ce qui suggère que l'EndoG soit une endonucléase secondaire dans l'exécution de la mort cellulaire. Contrairement à d'autres DNases impliquées dans l'apoptose, l'activation d'EndoG est indépendante de l'activité protéolytique des caspases (van Loo et al., 2001). Par conséquent EndoG pourrait être essentielle cours de morts cellulaires indépendantes des caspases ou lorsque les caspases sont inhibées.

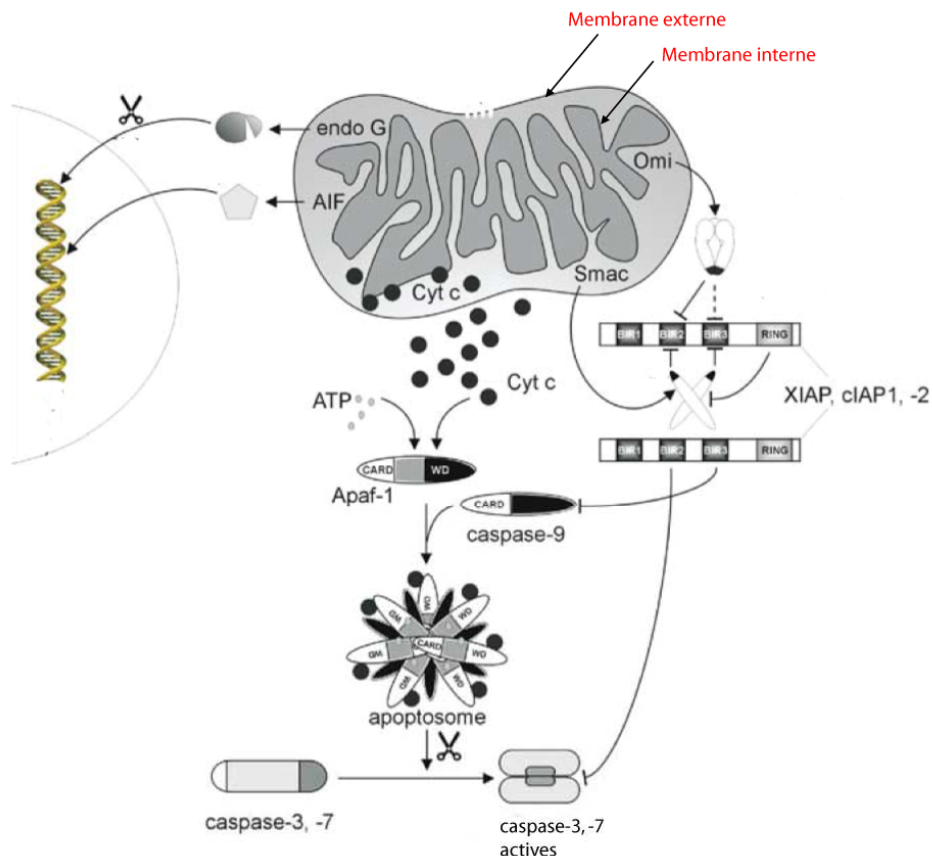


Figure 11. Mode d'action des facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux (d'après Saelens 2004).

○ *AIF*

L'AIF (Apoptosis Inducing Factor) est une flavoprotéine possédant une activité NADH oxydase qui est impliquée à la fois dans le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale et dans l'apoptose, à l'image du cytochrome c (Susin et al., 1999). L'AIF est adressé à la mitochondrie par un signal d'adressage situé à son extrémité N-terminal, qui sous l'effet de différents signaux pro-apoptotiques, est séparé de la protéine. Cette maturation

favorise son relargage vers le cytoplasme, puis sa translocation vers le noyau apoptotiques (Daugas et al., 2000; Loeffler et al., 2001).

Au cours de l'apoptose, l'AIF libéré, est impliqué dans l'induction du stade I de chromatolyse, caractérisé par une dégradation en fragments de grande taille (50 kb) et une condensation modérée de la chromatine (figure 11). Une partie de ces effets dépend directement de l'AIF, puisque celui-ci, en interagissant non spécifiquement avec des acides nucléiques (ADN ou ARN) par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques, peut induire leur agrégation (Vahsen et al., 2006; Ye et al., 2002). Cependant, l'AIF ne comporte pas d'activité nucléasique. La dégradation de l'ADN est en fait réalisée par un complexe protéique qui comprend l'AIF et la cyclophiline A (Cande et al., 2004).

Si la dégradation de l'ADN par l'AIF est clairement indépendante de l'activation des caspases, il apparaît cependant que sa libération dans le cytoplasme présente une dépendance variable vis-à-vis de leur activité protéolytique. Par exemple, en réponse à la déplétion du stock de NAD⁺ et d'ATP cellulaire provoquée par la sur-activation de PARP (Poly(ADP-ribose) polymerase-1), l'AIF est impliqué dans une nécrose indépendante de l'activité des caspases (Stambolsky et al., 2006; Yu et al., 2002). En revanche, l'AIF n'est pas libéré vers le cytoplasme au cours de l'apoptose stimulée par des inducteurs classiques (staurosporine, actinomycine D) lorsque les caspases sont inhibées (Arnoult et al., 2003).

b) Régulation de la perméabilité de la membrane mitochondriale par le PTP

La fonction des mitochondries dans l'apoptose repose sur les activités des multiples facteurs pro-apoptotiques qu'elles séquestrent (Kroemer et Reed, 2000). La modulation de la perméabilité de la membrane mitochondriale est par conséquent, un évènement critique dans l'induction de l'apoptose (Martinou et Green, 2001). Il est intéressant de remarquer qu'à l'image des bactéries, les mitochondries présentent une perméabilité membranaire sélective modulée par les conditions du milieu. Une grande variété de signaux régule notamment l'ouverture du PTP (Permeability Transition Pore), un pore multiprotéique mitochondrial impliqué à la fois dans l'homéostasie des mitochondries et dans la mort (Brenner et al., 2000). L'ouverture de ce canal est en effet modulée par le pH, les ions (Mg²⁺, phosphates inorganiques, Ca²⁺), les radicaux libres, l'ATP, certaines drogues (cyclosporine, quinacrine), ou des protéines (Bax, Bak) (Adams et Cory, 2001; Costantini et al., 2000; Halestrap, 2004; Jacotot et al., 2001; Petronilli et al., 1999). Cette sensibilité du PTP explique en partie le rôle intégrateur des mitochondries dans l'apoptose.

Les effets de l'ouverture du PTP sont sujets à controverse, puisqu'ils sont variables selon la nature de l'inducteur, et de son site d'interaction avec le PTP. Ce pore est en effet constitué de deux parties principales qui ne contribuent pas de façon équivalente à la perméabilisation des mitochondries : le VDAC (Voltage Dependant Anion Channel), inséré dans la membrane externe des mitochondries, et l'ANT (Adenine Nucleotide Translocase), inséré dans la membrane interne. Deux mécanismes sont notamment proposés afin de décrire la modulation du PTP par les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, Bax (figure 12.A). D'une part, l'interaction de Bax avec l'ANT peut induire l'ouverture du PTP (Marzo et al., 1998). Dans ce cas, le gonflement des mitochondries lié à l'entrée d'eau et de solutés serait à l'origine de la rupture de la membrane externe des mitochondries, et provoquerait du relargage des facteurs pro-apoptotiques intermembranaires (Vander Heiden et al., 1997). Selon un second mode d'action, en interagissant avec le VDAC, Bax pourrait former des canaux de grande taille permettant le passage du cytochrome c (Pastorino et al., 1999; Shimizu et al., 2000).

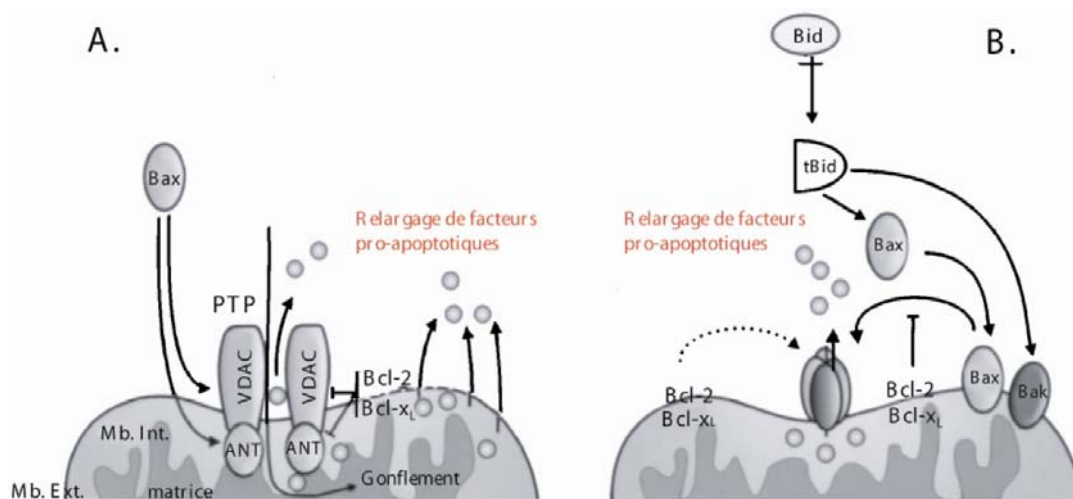


Figure 12. Mécanismes de perméabilisation des mitochondries par les protéines pro-apoptotiques BAX et BAK. A. L'ouverture du PTP est modulée par Bax. Son interaction avec l'ANT provoque le gonflement des mitochondries et la rupture de la membrane externe. Bax peut interagir avec le VDAC pour former un canal au travers duquel les facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux sont libérés. B. Les protéines pro-apoptotiques de la famille de Bcl2, Bax et BAK peuvent former des pores dans la membrane mitochondriale externe en synergie avec les effets pro-apoptotiques de tBid (d'après Van Loo, 2002).

c) Régulation de la perméabilité des mitochondries indépendante du PTP : des membres de la famille Bcl-2 font leur percée.

D'autres mécanismes de perméabilisation impliquant directement la partie lipidique de la membrane mitochondriale externe ont également été mis en évidence (figure 12.B)

(Zamzami et Kroemer, 2001). Les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 : Bax, Bak, et tBid peuvent en effet induire de façon directe la perméabilisation de la membrane externe des mitochondries. La détermination de la structure de certains membres de la famille Bcl-2 révèle en particulier, une homologie importante avec le domaine de translocation membranaire de toxines diphtériques et des colicines, capables de perméabiliser des membranes lipidiques (Chou et al., 1999; Muchmore et al., 1996). En accord avec cette observation, Bax et Bak peuvent former des pores à l'intérieur de membranes lipidiques suite à leur homo-oligomérisation (Antonsson et al., 2000; Basanez et al., 2002; Epand et al., 2002; Saito et al., 2000). Alors que Bax peut directement perméabiliser des membranes synthétiques *in vitro* (Basanez et al., 2002), la formation de pores mitochondriaux constitués de Bax *in vivo* dépend de plusieurs facteurs supplémentaires. En effet, bien qu'une partie de Bax puisse être adressée de façon constitutive aux mitochondries (Desagher et al., 1999), la protéine est principalement localisée dans le cytoplasme des cellules. C'est à la suite de plusieurs changements de conformation que Bax est redirigé vers les mitochondries et exerce son activité pro-apoptotique (Lalier et al., 2007). Ces changements de conformation sont favorisés par l'interaction de Bax avec les protéines à BH3 unique de la famille Bcl-2, telles que tBid, influencés par le pH et la température, ou encore inhibés par des phosphorylations (Cartron et al., 2004; Desagher et al., 1999; Gardai et al., 2004; Pagliari et al., 2005; Tafani et al., 2002). Bax est également séquestré dans sa forme inactive par plusieurs protéines différentes. Parmi ces protéines, Bcl-2 et Bcl-XL jouent un rôle fondamental dans la régulation de l'apoptose en inactivant Bax à la fois dans le cytoplasme et au niveau des mitochondries (Kim et al., 2006; Yang et Korsmeyer, 1996). En opposition avec l'activité de Bcl-2 et de Bcl-XL, tBid stimule les effets pro-apoptiques de Bax. tBid favorise la libération de Bax de Bcl-2 et de Bcl-XL, induit son changement de conformation, son oligomérisation et son insertion dans la membrane mitochondriale (Eskes et al., 2000; Terrones et al., 2004). Ces effets sont en partie liés à l'activité déstabilisatrice de membrane de tBid. En effet, *in vitro*, tBid interagit avec et perméabilise des membranes lipidiques anioniques contenant de la cardiolipine, un phospholipide spécifique des membranes mitochondriales (Kuwana et al., 2002; Lutter et al., 2000). En accord avec ces résultats, l'adressage de tBid à la mitochondrie est dépendant de la présence de la cardiolipine au niveau des sites de contact entre les membranes internes et externes des mitochondries (Lutter et al., 2000; Lutter et al., 2001).

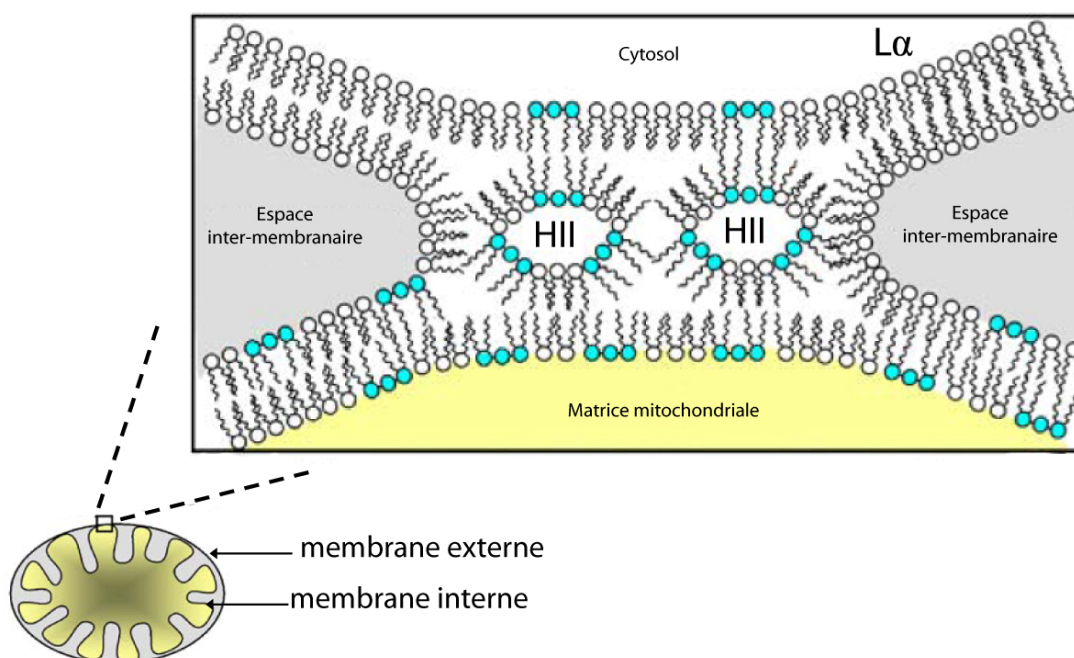


Figure 13. Structure des sites de contact entre la membrane interne et la membrane externe des mitochondries. La cardiolipine (en bleu) concentrée au niveau de ces sites permet d'unir la membrane externe et la la membrane interne des mitochondries, en favorisant la formation de la phase lipidique HII. tBid, en interagissant avec la cardiolipine pourrait augmenter la proportion de la phase HII et déstructurer les sites de contact (d'après Gonzalvez, 2007).

La déstabilisation des membranes par tBid ne semble pas impliquer la formation de pores, mais être liée à une transition de la phase lipidique des membranes d'une phase plane ($L\alpha$), vers une phase hexagonale (HII). tBid, en interagissant avec la cardiolipine, favorise en effet, l'induction de courbures négatives caractéristiques de la phase HII (Erand et al., 2002). Ces modifications peuvent expliquer que tBid soit capable d'induire la fuite de cytochrome c depuis les mitochondries (figure 13) (Gonzalvez et Gottlieb, 2007). Cependant, cet effet est largement amplifié en présence de Bax (Gonzalvez et al., 2005; Korsmeyer et al., 2000). tBid pourrait en fait faciliter la libération du cytochrome c à travers les pores formés par Bax ou Bak en mobilisant le cytochrome c dans l'espace intermembranaire mitochondrial (Choi et al., 2007).

En effet, le cytochrome c est en grande partie lié à la cardiolipine dans l'espace intermembranaire mitochondrial (Nicholls, 1974; Rytomaa et al., 1992). L'interaction de tBid avec la cardiolipine pourrait en déplacer le cytochrome c et augmenter ainsi la quantité de cytochrome c libre dans l'espace intermembranaire (Scorrano et al., 2002; Uren et al., 2005).

d) Les protéines de la famille Bcl-2 : une discussion de famille autour de la mort cellulaire

Cette famille de protéines centrale dans la régulation de l'apoptose, est établie sur la structure d'un domaine conservé de type BH (Bcl-2 Homology), essentiel à leur fonction de régulation de l'apoptose (Adams et Cory, 1998; Cory et Adams, 2002). Ce domaine est répété quatre fois (BH1 à BH4) dans la protéine anti-apoptotique Bcl-2, mais le nombre de répétition de ce domaine est variable dans la séquence des différents membres de la famille Bcl-2 (figure 14).

Malgré cette homologie, les protéines de la famille Bcl-2 présentent des activités antagonistes. On y distingue en effet des protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-XL, MCL-1) et des protéines pro-apoptotiques (Bid, Bim, Bmf, Bad, PUMA, NOXA, Bax et Bak).

Une seconde dichotomie portant sur ces protéines pro-apoptotiques est également établie selon leur niveau d'intervention dans les voies de régulation de l'apoptose, depuis l'intégration des signaux de stress jusqu'à l'altération de la perméabilité de la membrane mitochondriale (figure 15).

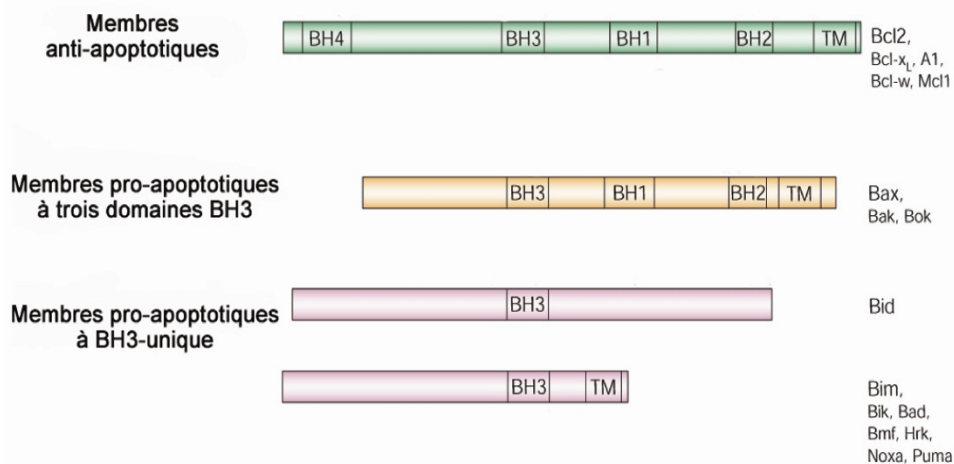


Figure 14. Classification et structure des protéines de la famille Bcl-2 (d'après Cory, 2002).

Les membres à domaine BH3 unique dits «inactivateurs», tels que Bad ou NOXA, induits par les stress cellulaires, interviennent dans les premières étapes de l'induction de l'apoptose. Ces protéines agissent en libérant les membres «activateurs» Bid, Bim ou PUMA des membres anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-XL ou MCL-1 (Kim et al., 2006). La déséquestration de ces membres «activateurs» à BH3 unique permet, par la suite, d'induire les changements conformationnels nécessaires à la translocation de Bax vers les mitochondries.

La perméabilisation de la membrane mitochondriale est par conséquent dépendante d'un jeu de séquestration / déséquestration entre les membres de la famille Bcl-2 (Willis et al., 2007). Ce mécanisme est influencé en partie par leur niveau d'expression (Puthalakath et Strasser, 2002). La surexpression des protéines à BH3 unique est induite par exemple par la protéine p53 sous l'effet de stress hypoxiques, nutritifs ou génotoxiques (Levine et al., 2006).

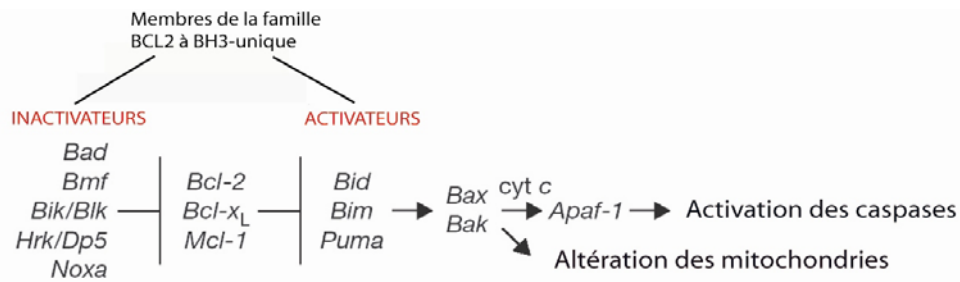


Figure 15. Hiérarchie d'activation entre les membres de la famille Bcl-2 (d'après Kim, 2006).

Alors que la production des protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2 peut être stimulée par l'activation de l'axe de survie PI3K/Akt/PTEN, sous l'effet de facteurs de croissance (Mitsiades et al., 2004). D'autres niveaux de régulation sont également impliqués. Des protéines étrangères à la famille Bcl-2 participent à la signalisation des stress cellulaires et modulent l'activité des membres de la famille (Lucken-Ardjomande et Martinou, 2005). Bax peut en effet être séquestré, et inhibé dans le cytoplasme par KU70, les isoformes de 14-3-3, ARC ou encore par l'humanine (Guo et al., 2003; Gustafsson et al., 2004; Nomura et al., 2003; Sawada et al., 2003). L'activité de Bcl-2 est modulée d'autre part par p53 ou Nur77. Initialement localisées dans le noyau, p53 et Nur77 sont redirigées vers les mitochondries sous l'effet de multiples stress. Alors que p53 peut interagir et bloquer Bcl-2 ou (Leu et al., 2004; Mihara et al., 2003), Nur77 convertit l'activité anti-apoptotique de Bcl-2 en activité pro-apoptotique (Moll et al., 2006).

Des modifications post-traductionnelles sont également impliquées dans la régulation de l'activité des protéines de la famille Bcl-2. Par exemple, l'activité pro-apoptotique de Bim est augmentée dans sa forme phosphorylée par les kinases N-terminales de c-Jun (JNK) (Putcha et al., 2003), de même, la phosphorylation de Bcl-2 est nécessaire à son activité anti-apoptotique dans certaines lignées cellulaires (Ruvolo et al., 2001). A l'inverse, Bax est inhibé lorsqu'il est phosphorylé par l'Akt (Gardai et al., 2004). Enfin, l'adressage de Bid à la mitochondrie requiert une myristoylation, ainsi qu'une maturation protéolytique qui est inhibée lorsque Bid est phosphorylé (Desagher et al., 2001; Zha et al., 2000). La diversité des

mécanismes de régulation de l'activité des protéines de la famille Bcl-2 témoigne du rôle intégrateur de ces protéines dans l'apoptose.

IV. Des morts cellulaires programmées en interaction

Chaque type de mort cellulaire se distingue par ses caractéristiques morphologiques et biochimiques. Malgré cette distinction, certaines morts cellulaires présentent un mélange des caractères de deux formes de morts différentes ou passent d'un type de mort cellulaire à l'autre (Ha et Snyder, 1999; Leist et Jaattela, 2001; Lockshin et Zakeri, 2004)

Ces observations peuvent en partie être expliquées par les effets pléiotropes des stress cellulaires. Les radiations induisent par exemple des stress à la fois au niveau du noyau et du réticulum endoplasmique. Les stress génotoxiques liés aux radiations favorisent généralement l'activation de p53 qui stimule l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (Levine et al., 2006). Au niveau du réticulum, les radiations stimulent l'apoptose et l'autophagie (Moretti et al., 2007; Yorimitsu et Klionsky, 2007). Le type de mort cellulaire dominant dans ce cas dépend certainement du niveau d'activation de chaque voie de signalisation. Par ailleurs, l'activation de certains acteurs moléculaires dans une forme de mort cellulaire peut conduire à l'inhibition des protéines impliquées dans un autre type de mort. Les protéines Bcl-2 et Bcl-XL offrent, par exemple, en plus de leur activité anti-apoptotique, une protection contre l'autophagie et la nécrose (Maiuri et al., 2007; Shimizu et al., 1996; Shimizu et al., 2004). De plus, les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak pourraient bloquer l'autophagie en inhibant PTEN et en permettant ainsi l'activation de mTOR via Akt (Moretti et al., 2007). Ce recouvrement moléculaire entre les voies de l'apoptose, et celles de l'autophagie ou de la nécrose pourrait expliquer que bien que plusieurs types de morts cellulaires soient stimulées simultanément, l'apoptose soit dominante.

Les récepteurs impliqués dans la mort cellulaire, tels que le TNFR1, sont également à l'origine de l'induction de plusieurs formes de morts cellulaires. Ils peuvent en effet stimuler l'apoptose (Varfolomeev et al., 1998; Zhang et al., 1998), la nécrose (Foghsgaard et al., 2002; Lin et al., 2004), ou l'autophagie (Inbal et al., 2002).

Bien que les décisions soient en partie déterminées par le type cellulaire, il apparaît évident qu'elles obéissent à une hiérarchie moléculaire dans l'exécution des programmes de mort cellulaire (Holler et al., 2000; Khwaja et Tatton, 1999). En effet, alors que l'apoptose est généralement induite en réponse à la stimulation de ces récepteurs, l'inhibition des

caspases; favorise l'induction de la nécrose ou de l'autophagie (Vandenabeele et al., 2006; Yu et al., 2004). Cette situation a notamment été caractérisée pour le récepteur TNFR1.

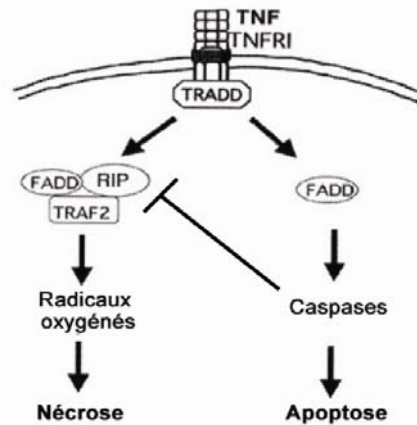


Figure 16. Le récepteur TNFR1 induit l'apoptose et la nécrose. L'activation des caspases inhibe la voie nécrotique (d'après Lin 2004).

Dans ce cas, la bifurcation entre les voies apoptotiques et nécrotiques en aval de l'activation du récepteur TNFR1 dépend des protéines associées à la protéine adaptatrice FADD. Lorsque la caspase 8 est recrutée par FADD, l'apoptose est induite, alors qu'une nécrose liée à une augmentation des radicaux oxygénés est stimulée lorsque FADD recrute TRAF2 et RIP (figure 16) (Lin et al., 2004). Bien que ces deux voies puissent être induites par un même récepteur, l'exclusivité de l'activation d'une voie sur l'autre est possible. En effet, l'activation des caspases induit le clivage de RIP, et inhibent ainsi la voie nécrotique issue de l'activation de TNFR1.

Alternativement, il faut noter que malgré l'inhibition de l'apoptose au niveau des caspases, les mitochondries endommagées au cours des étapes précoces de l'apoptose, finissent par présenter une altération de leur fonction bioénergétique. Cette atteinte des mitochondries pourrait stimuler l'autophagie ou la nécrose lorsque les caspases sont inhibées (Xue et al., 2001). Par conséquent, le passage entre les types de morts cellulaires pourrait également s'effectuer à différents stades de l'exécution du processus de mort.

La hiérarchie établie entre les différentes formes de mort cellulaire pourrait être d'autre part d'ordre cinétique. On notera notamment que l'exécution de la mort cellulaire par apoptose peut s'effectuer en quelques minutes alors que la nécrose prend plusieurs heures (figure 17) (Green, 2005; Jin et al., 2007).

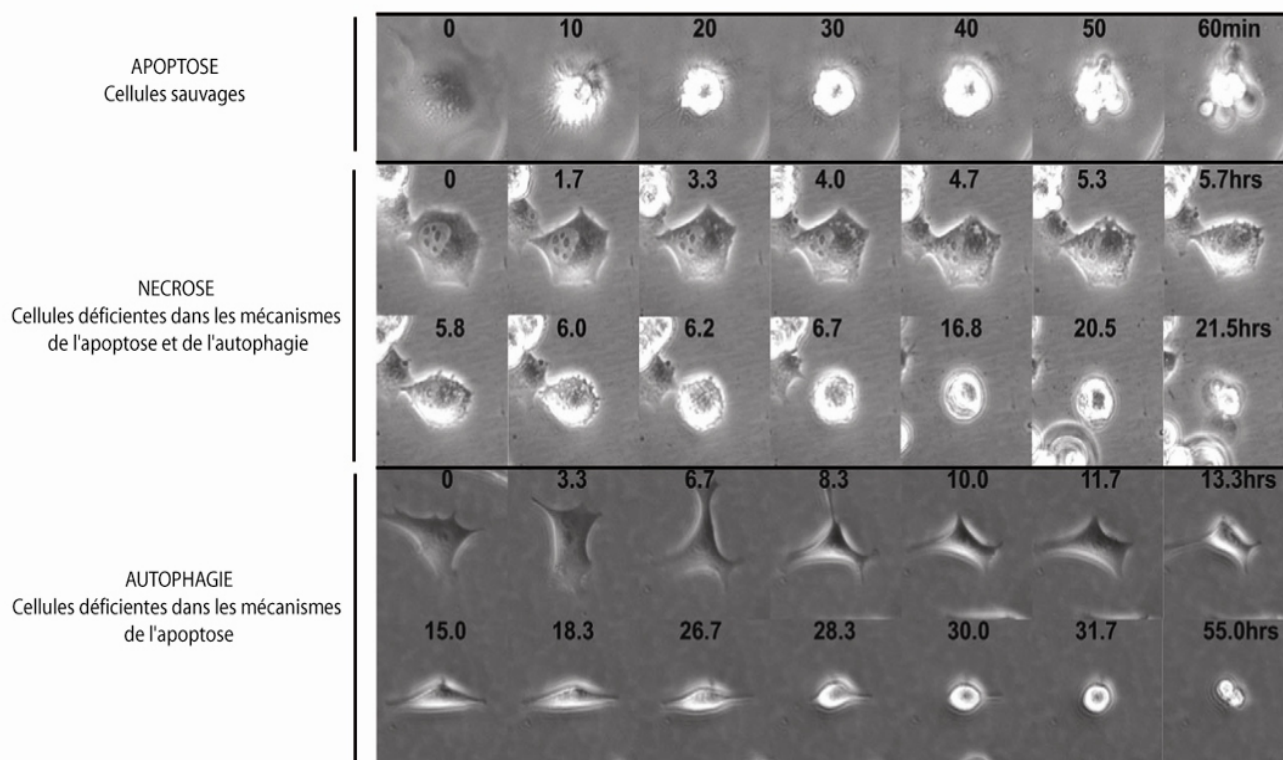


Figure 17. Cinétiques des différentes formes de mort cellulaire (d'après Jin, 2007 et Degenhardt, 2006). Des cellules épithéliales de rein sauvages, ou présentant un dysfonctionnement des voies apoptotiques seulement ou des voies apoptotiques et autophagiques, soumises à un stress nutritif, ont été observées par videomicroscopie visible. Des changements morphologiques extrêmement importants surviennent dans un intervalle de dix minutes au cours de l'apoptose, alors que les modifications les plus importantes apparaissent progressivement pendant plusieurs heures au cours de la nécrose ou de l'autophagie. Le stress métabolique induit les trois types de morts cellulaires cependant, la nécrose prend place uniquement lorsque l'apoptose et l'autophagie sont déficientes, d'autre part, l'apoptose domine dans les cellules sauvages.

Enfin, la prévalence d'une mort cellulaire peut être dictée par l'état énergétique de la cellule. En effet, l'apoptose est dépendante de l'ATP intracellulaire, et l'on constate qu'elle peut laisser place à la nécrose lorsque les mitochondries sont non fonctionnelles, ou que les stocks en ATP sont réduits (Herceg et Wang, 1999; Leist et al., 1999). Cette dépendance explique notamment que l'activation de PARP et des caspases soient mutuellement exclusives. En effet, la suractivation de PARP par les dommages à l'ADN, induit une nécrose et défavorise la formation de l'apoptosome en provoquant la déplétion des cellules en NAD et en ATP (Chiarugi et Moskowitz, 2002; Daugas et al., 2000), alors que les caspases activées induisent le clivage de PARP afin de préserver les stocks énergétiques nécessaires au démantèlement cellulaire (figure 18) (Zong et al., 2004).

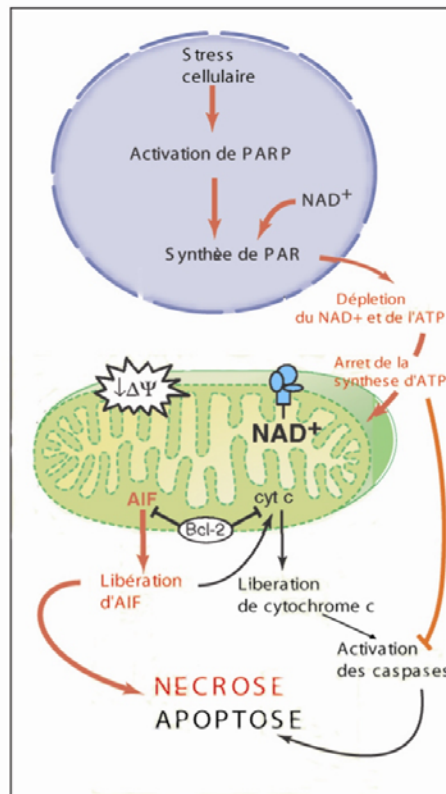


Figure 18. PARP induit la nécrose et défavorise l'activation des caspases en réduisant les stocks cellulaires de NAD⁺ et d'ATP (d'après Chiarugi 2002).

Le caractère non-inflammatoire, la rapidité d'exécution et les effets inhibiteurs de l'apoptose sur les autres types de morts cellulaires, pourraient expliquer que ce type de mort cellulaire soit le plus fréquemment observé. Il est cependant très probable que dans la majorité des cas, les voies de signalisation à l'origine d'autres types de morts cellulaires soient également activées (Godefroy et al., 2004; Sperandio et al., 2000).

V. La mort cellulaire un obstacle contre le cancer

L'étiologie des cancers repose sur de multiples facteurs génétiques et épigénétiques qui conduisent invariablement à l'altération de l'intégrité génomique. L'ampleur de cette atteinte dans les cellules tumorales est telle, que les principes du processus de cancérisation sont difficilement identifiables au niveau du génome (Balmain, 2001; Lengauer et al., 1998). L'étude génétique des tumeurs montre en effet que le cancer regroupe un ensemble de pathologies qui se forment, et évoluent de façon différente selon le type cellulaire à l'origine du cancer. Cette hétérogénéité est également retrouvée parmi les cancers provenant d'un

même type cellulaire ou encore parmi les clones issus d'une même tumeur (Sjoblom et al., 2006).

Du point de vue de la physiologie cellulaire cependant, le cancer s'inscrit dans une logique évolutive qui vise à contourner les règles homéostatiques, qui contrôlent la prolifération cellulaire et régulent les spécificités tissulaires. Depuis l'expansion de clones néoplasiques jusqu'à leur implantation métastatique, le développement des cancers est conditionné par l'acquisition de nouvelles propriétés, leur permettant de surpasser les contraintes générées par l'oncogénèse (figure 19) (Fearon et Vogelstein, 1990; Gupta et Massague, 2006).

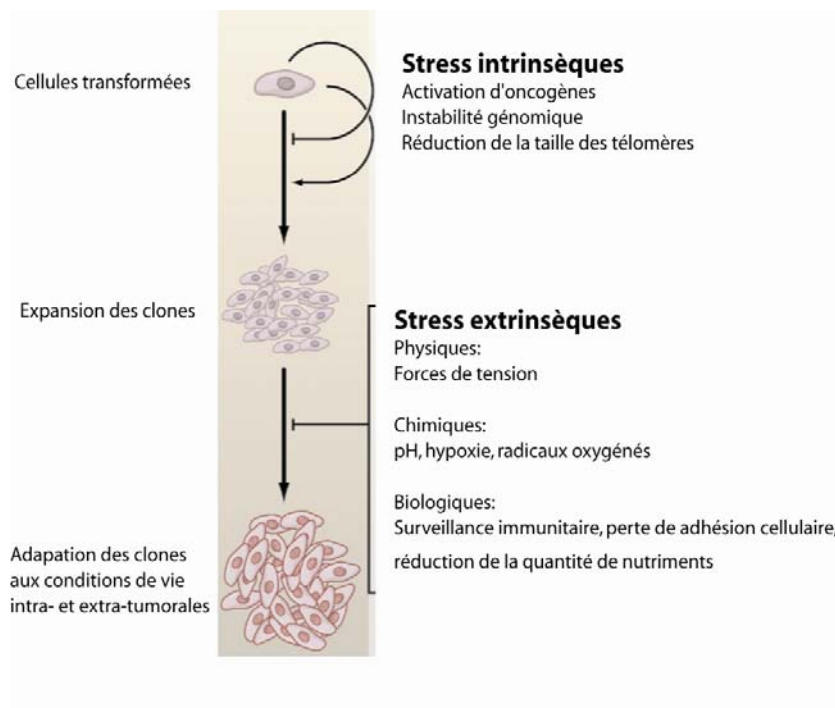


Figure 19. Stress associés à l'oncogénèse (d'après Gupta, 2006).

L'hypoxie intra-tumorale (Graeber et al., 1996), les carences en nutriments ou en facteurs de croissance issues de l'accroissement des besoins des cellules cancéreuses, ou encore les stress liés à la suractivation d'oncogènes (Kauffmann-Zeh et al., 1997), constituent des pressions de sélection qui induisent l'élimination d'un grand nombre de clones. Ces sélections favorisent cependant l'émergence des plus résistants. Les évolutions successives des cancers peuvent être résumées par l'acquisition de six propriétés nécessaires à la progression de la malignité d'un clone néoplasique. Instabilité génomique, prolifération autonome, réplification illimitée, activité angiogénique, capacité métastatique, et résistance aux processus de mort cellulaire constituent l'ensemble des propriétés nécessaires aux cellules cancéreuses afin d'assurer leur survie dans des conditions de stress (Greaves, 2007; Hanahan

et Weinberg, 2000; Williams, 1991). Nous reprendrons ici ces propriétés en considérant leurs interactions avec la mort cellulaire, afin d'illustrer de quelles façons l'inhibition des mécanismes de la mort cellulaire participe au franchissement des barrières homéostatiques par les cellules cancéreuses, et à l'abandon de leur « comportement social ».

V.1. La mort cellulaire, une barrière contre l'instabilité génomique

La majorité des cancers se déclare tardivement au cours de la vie, ce qui témoigne du caractère évolutif de la maladie. L'oncogénèse est en effet comparable à un processus de différenciation promu par une instabilité génomique des cellules cancéreuses (Harris, 2004; Jones et Baylin, 2002; Merlo et al., 2006), qui favorise leur adaptation aux conditions de vie intra-tumorales (Greaves, 2007; Gupta et Massague, 2006). Le maintien de l'intégrité génomique est cependant assuré par deux remparts opposés à l'oncogénèse, constitués par les systèmes de réparation de l'ADN et par les mécanismes de la mort cellulaire (Norbury et Zhivotovsky, 2004). C'est pourquoi, l'atteinte des gènes impliqués dans ces systèmes constitue une condition *sine qua none* au développement des tumeurs (Bartkova et al., 2005; Wooster et al., 1995; Zhivotovsky et Kroemer, 2004). Il est intéressant de remarquer que l'altération de l'un de ces deux remparts atteint l'intégrité du second, ce qui résulte en une amplification de l'instabilité génomique. La mutation du gène MSH2 (MutS Homologue-2), impliqué dans la réparation des mésappariements de l'ADN, génère par exemple une instabilité des microsatellites dans les cancers du colon, à l'origine de l'inactivation de Bax (Fishel et al., 1993; Rampino et al., 1997; Thibodeau et al., 1993). Réciproquement, l'inhibition de la mort cellulaire permet aux cellules d'accumuler des altérations génomiques. Des lymphocytes T déficients en Bid présentent notamment une instabilité génomique supérieure à celle tolérée par les cellules sauvages (Zinkel et al., 2005).

L'influence réciproque entre la signalisation des dommages à l'ADN aux voies de la mort cellulaire se caractérise sur le plan moléculaire à travers plusieurs interfaces. L'intervention des protéines de la famille de p53 dans le contrôle de l'intégrité de l'ADN illustre plus particulièrement cette situation (Efeyan et Serrano, 2007; Melino et al., 2004). En réponse à des coupures doubles ou simples brins de l'ADN, des complexes multiprotéiques, tels que le complexe 9-1-1, se forment sur les lésions et activent les kinases ATR et ATM (Bermudez et al., 2003). Ces kinases activent à leur tour les kinases chk1 et chk2 qui en modulant l'état de phosphorylation de p53 régulent son activité pro-apoptotique (Motoyama et Naka, 2004). L'efficacité de l'induction de l'apoptose par p53 s'explique par son implication à plusieurs niveaux de régulation (figure 20). p53 favorise l'expression de

membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 : Bax, NOXA, PUMA ou Bid; inhibe directement les membres anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL (Mihara et al., 2003), induit la translocation de Bax à la mitochondrie (Chipuk et al., 2004) et l'activation de Bak (Leu et al., 2004), ou encore favorise la perméabilisation de la membrane mitochondriale par la protéine histone H1.2 (Konishi et al., 2003). La place de p53 au carrefour entre les voies de signalisation de réparation de l'ADN et celles de l'apoptose en fait un obstacle majeur à l'émergence des cancers, ce qui justifie la fréquence de mutation de p53 ou des voies dépendantes de p53.

Bien que les protéines de la famille de p53 jouent un rôle central dans la réponse aux stress génotoxiques, leur signalisation est également coordonnée par d'autres voies moléculaires. Parmi les protéines impliquées, le récepteur nucléaire orphelin, Nur77, induit l'apoptose sous l'effet de certaines lésions à l'ADN (Wilson et al., 2003). Alors que l'implication de l'activité transcriptionnelle de Nur77 dans sa fonction pro-apoptotique reste indéterminée, la relocalisation de cette protéine du noyau vers les mitochondries contribue de façon importante à l'induction de la mort cellulaire. L'efficacité cytotoxique de Nur77 semble en effet résider dans sa capacité à convertir l'activité anti-apoptotique de Bcl-2 en activité pro-apoptotique (figure 20) (Lin et al., 2004).

La caspase 2, en étant adressée au noyau, participe également à la transduction de signaux pro-apoptotique en réponses aux dommages à l'ADN. Son activation s'effectue à travers la formation du PIDDosome, un complexe multiprotéique constitué de PIDD, RAIDD impliqué dans la reconnaissance des altérations de l'ADN (Read et al., 2002; Tinel et Tschopp, 2004; Zhivotovsky et Orrenius, 2005). La caspase 2 activée dans ce complexe exerce son activité pro-apoptotique en perméabilisant directement la membrane mitochondriale et en activant Bax et Bak par l'intermédiaire de Bid (figure 20) (Bonzon et al., 2006; Guo et al., 2002).

Enfin, dans certains cas, l'élimination des cellules lésées est indépendante de l'apoptose et fait intervenir une nécrose. PARP-1, impliquée dans la signalisation des dommages à l'ADN, ajoute des polymères d'ADPribose aux lésions et consomme du NAD⁺. Sa suractivation peut par conséquent induire une déplétion de l'ATP intracellulaire (Yu et al., 2002). Cette réduction des niveaux d'ATP et de NAD⁺ provoque un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, et l'augmentation de la quantité des radicaux oxygénés à l'origine d'une nécrose accompagnée de la translocation de l'AIF depuis les mitochondries vers le noyau (figure 18) (Chiarugi et Moskowitz, 2002; Daugas et al., 2000).

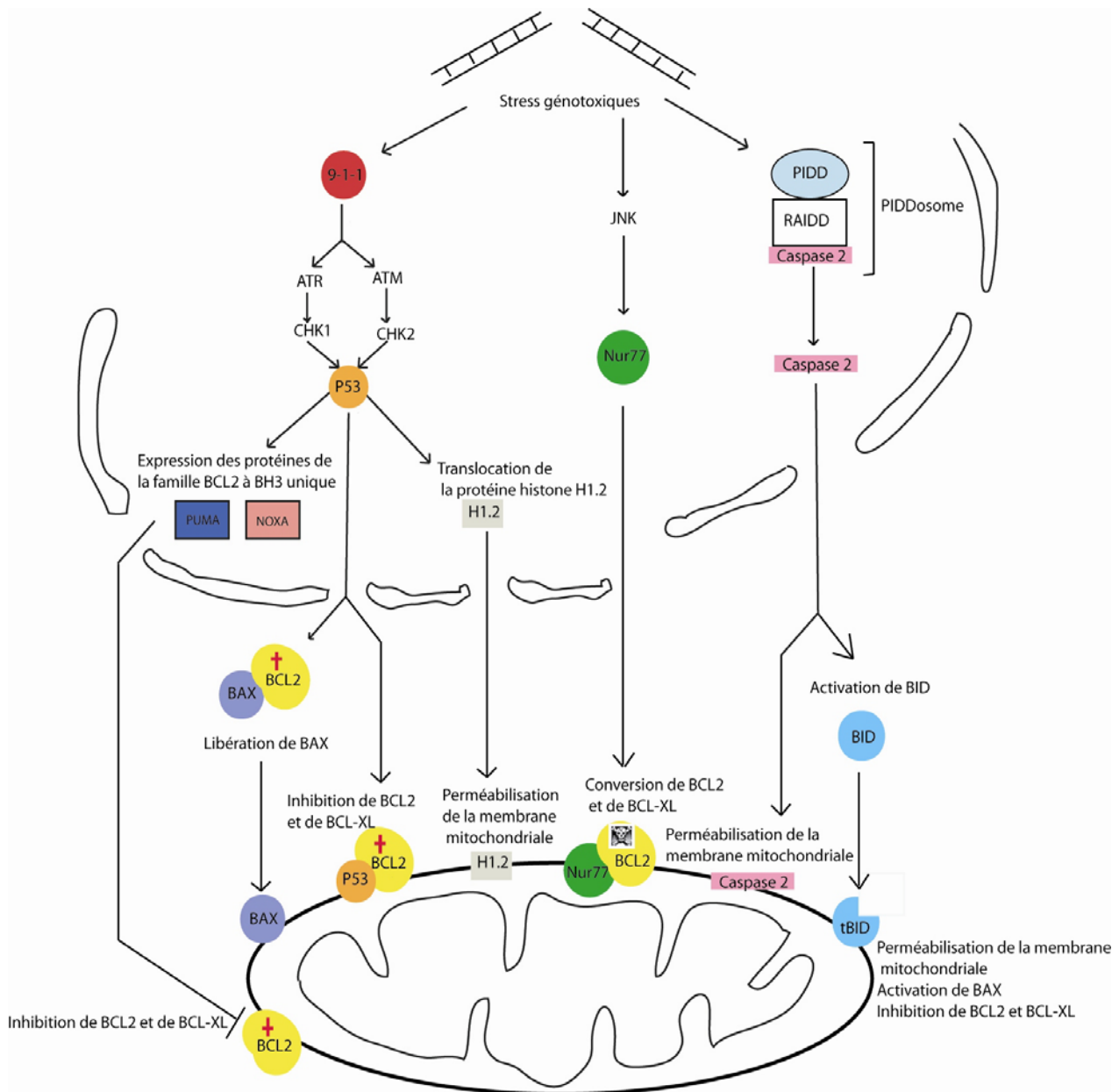


Figure 20. Voies de signalisation pro-apoptotiques impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN.

V.2. Prolifération autonome des cellules cancéreuses

La capacité proliférative des cellules cancéreuses constitue l'un des moteurs de l'oncogénèse, la production d'une grande quantité de clones augmentant la probabilité d'émergence de clones mieux adaptés aux conditions de stress associées aux tumeurs. On constate cependant que ce moteur est freiné par les voies de signalisation de la mort cellulaire (Abrams, 2002; Nahle et al., 2002). En conséquence, la capacité proliférative des cellules

cancéreuses ne se résume pas seulement à l'augmentation de la fréquence des entrées dans le cycle cellulaire, mais implique également une inhibition de la mort cellulaire.

a) Des oncogènes suppresseurs de tumeurs

L'origine de la cytotoxicité associée à une prolifération excessive peut en partie s'expliquer par les mitoses inégales, et les catastrophes mitotiques générées par les entrées inappropriées dans le cycle cellulaire (Castedo et al., 2004). Cependant, les voies de signalisation de la prolifération stimulent plus directement la mort cellulaire. En effet, des oncogènes tels que E1A, E2F-1, ou Myc capables d'activer le cycle cellulaire, induisent également l'apoptose (Evan et al., 1992; Hao et al., 2007; Lowe et al., 2004; White et al., 1984).

Il est intéressant de remarquer par exemple, que les fonctions prolifératives et pro-apoptotique de Myc ne peuvent être séparées (Amati et al., 1993; Berns, 2005; Eischen et al., 2001). En effet, Myc régule à la fois l'expression de gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire et dans l'apoptose. Ainsi, en augmentant l'expression de ARF, MYC modifie l'équilibre régissant la stabilité de p53 (Zindy et al., 1998). ARF inhibe en effet l'ubiquitine ligase mdm2 impliquée dans la dégradation de p53 par le protéasome, ce qui augmente les quantités de p53 dans la cellule. Par la suite, l'activation de p53 peut induire l'apoptose par l'intermédiaire de Bax (Dansen et al., 2006; Juin et al., 2002). Cette relation peut expliquer que la surexpression de MYC dans les lymphomes induit une mortalité importante des cellules, opposée à la formation de tumeurs. Afin de compenser ces effets suppresseurs de tumeur, la suractivation de MYC est potentialisée par d'autres mutations. La translocation t(14,18), à l'origine de la surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2, favorise particulièrement le développement de lymphomes dans des modèles murins surexprimant MYC (Strasser et al., 1990; Vaux et al., 1988).

Le même résultat peut être obtenu par la stimulation des voies de survie (Blume-Jensen et Hunter, 2001; Bouleau et al., 2005; Wendel et al., 2004). L'activation constitutive de l'axe de survie PI3K/Akt par RAS, fréquemment observée dans les cancers, potentialise les effets prolifératifs de MYC et illustre cette stratégie (figure 21) (Chin et al., 1999; Kauffmann-Zeh et al., 1997). RAS active la kinase Akt qui stimule d'une part la prolifération, et favorise d'autre part la survie en activant le gène codant la protéine anti-apoptotique Bcl-2, et en inhibant la caspase 9 et Bad (Arico et al., 2001). Cette relation entre les voies de survie et de la prolifération pourrait expliquer que la cytotoxicité des oncogènes prolifératifs soit

particulièrement observable dans des conditions où les cellules sont privées de facteurs de survie (Evan et al., 1992; Sakamuro et al., 1995).

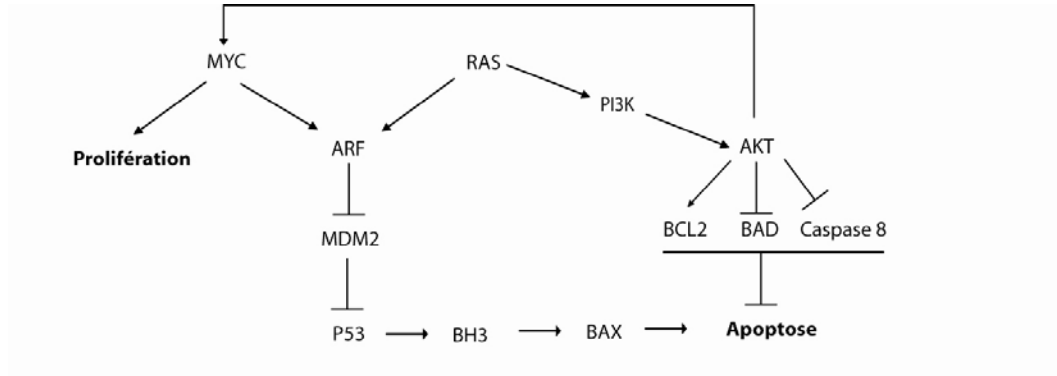


Figure 21. Synergie entre les activités de RAS et de MYC au cours de l'apoptose.

b) Rôle des protéines de la famille Bcl-2 dans le contrôle du cycle cellulaire

Certains membres de la famille Bcl-2 présentent à la fois une fonction dans la mort cellulaire et dans la régulation du cycle cellulaire. Cette fonction supplémentaire, exercée parallèlement à l'activité anti-apoptotique de Bcl-2 et de Bcl-XL, dépend également de leur domaine BH3 (Janumyan et al., 2003). Dans certains contextes cellulaires, la surexpression de ces protéines favorise la survie, mais induit un arrêt de la prolifération en bloquant les cellules en G0. Cet effet inhibiteur sur le cycle cellulaire pourrait expliquer que la surexpression transgénique de Bcl-2 dans des lymphocytes induise des tumeurs de faible pénétrance après une longue latence (McDonnell et Korsmeyer, 1991).

A l'inverse, alors que Bax est anti-prolifératif par son activité pro-apoptotique, il est capable de stimuler les entrées dans la phase S (Brady et al., 1996). L'effet dominant de Bax semble également dépendre du contexte ainsi que du type cellulaire. La déficience de la fonction pro-apoptotique de Bax favorise par exemple la formation de tumeurs sous l'effet de la surexpression de l'oncogène E1A (Degenhardt et al., 2002), cependant, la surexpression de Bax accélère la formation de lymphomes déficients en p53 (Knudson et al., 2001).

Enfin, Bid régule le cycle cellulaire, à travers la signalisation des dommages à l'ADN. Bid induit en effet un arrêt du cycle cellulaire en phase S, lorsqu'il est phosphorylé par les kinases ATM et ATR impliquées dans la signalisation des stress génotoxiques (Kamer et al., 2005; Zinkel et al., 2005). Cette activité pourrait expliquer que la déficience en Bid soit

corrélée à une augmentation de la résistance des cellules à l'apoptose, ainsi qu'à une augmentation de l'instabilité génomique.

Si Bid présente un caractère suppresseur de tumeurs à la fois à travers son activité pro-apoptotique et son rôle inhibiteur du cycle cellulaire, les protéines Bcl-2, Bcl-XL et Bax en revanche, contribuent au cycle cellulaire et à l'apoptose de façon antagoniste. La domination d'une fonction sur l'autre semble être dépendante du contexte cellulaire, mais les bases moléculaires de cette régulation ne sont pas encore définies.

V.3. Adaptation aux stress métaboliques et hypoxiques associés à l'oncogénèse:

« autophagie et nécrose au menu ».

Le diagnostic des cancers est le plus souvent associé à la détection de tumeurs macroscopiques, témoignant d'une activité intense de prolifération des cellules cancéreuses. Comme l'indique leur analyse histologique, les tumeurs renferment à ce stade de nouveaux réseaux de vaisseaux sanguins assurant les besoins trophiques et énergétiques qui limitent rapidement l'excroissance des tumeurs. En condition de stress métabolique, les cellules saines stimulent une réponse angiogénique en produisant des facteurs de croissance pro-angiogéniques (HIF, VEGF, Angiopoietine), réduisent leur activité de synthèse protéique, augmentent la glycolyse et développent une réponse adaptative en induisant l'autophagie (Kuma et al., 2004; Lum et al., 2005). Cette réponse permet de subvenir temporairement aux carences par le recyclage de composants cellulaires, mais la réponse autophagique adaptative n'est pas systématique, puisque la privation des cellules en facteurs de croissance apportés par le sang ou la déplétion des stocks d'ATP sont des signaux pro-apoptotiques puissants.

Les cancers s'adaptent aux stress métaboliques en détournant progressivement chaque type de mort cellulaire (Degenhardt et al., 2006; Jin et al., 2007). Ils profitent tout d'abord de l'inhibition précoce de l'apoptose au cours de l'oncogénèse, afin d'exploiter l'autophagie. (Ogier-Denis et Codogno, 2003; Okada et Mak, 2004). Cependant, dans des conditions de stress métaboliques prolongées, l'autophagie s'amplifie, et conduit à une mort autophagique des cellules cancéreuses, ce qui peut expliquer que cette activité soit également inhibée dans un second temps (Kondo et Kondo, 2006; Liang et al., 1999). La suractivation fréquente dans les cancers des voies de survie impliquant la kinase Akt, permet notamment d'inhiber l'autophagie par la phosphorylation de mTOR (Downward, 2004; Guertin et Sabatini, 2005; Li et al., 1997). L'activation constitutive de cette voie désensibilise ainsi les cellules cancéreuses à la mort par autophagie stimulée par la réduction des nutriments dans le milieu.

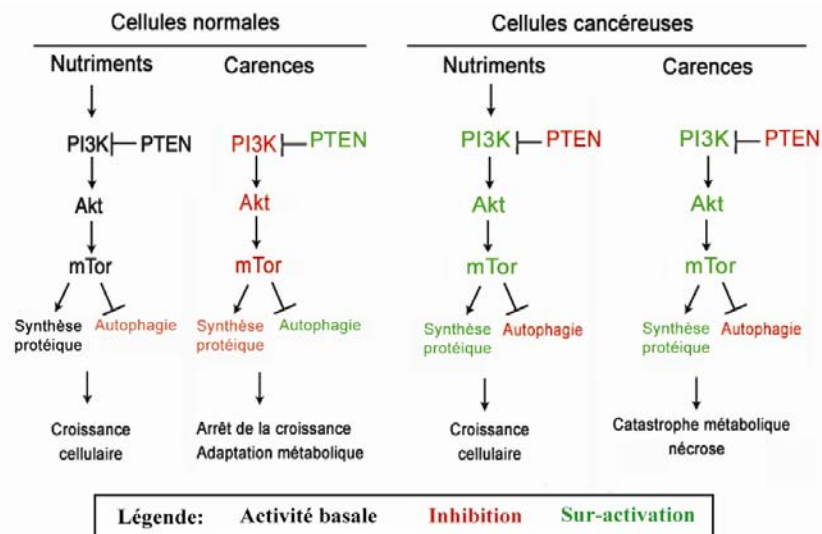


Figure 22. Réponses de cellules normales ou de cellules cancéreuses aux stress métaboliques. L'activité de la voie PI3K/PTEN/Akt/mTOR est modulée par les nutriments. Cette voie est active physiologiquement dans les cellules normales, et s'inactive lorsque les apports en nutriments sont insuffisants, ce qui favorise l'autophagie et permet aux cellules de s'adapter. L'activation constitutive des PI3Kinases ou de l'Akt dans les cellules cancéreuses s'oppose à cette réponse adaptative et les conduit vers une nécrose (d'après Jin, 2007).

Privées de cette réponse adaptative aux stress métaboliques, les cellules cancéreuses finissent par dégénérer par une mort nécrotique. Il apparaît cependant que l'induction de la nécrose intra-tumorale soit bénéfique au développement des cancers. En effet, le déversement du contenu cytosolique des cellules dans le milieu génère une inflammation qui, en favorisant l'invasion de la tumeur par des cellules endothéliales, est à l'origine de la néo-angiogenèse intra-tumorale (Balkwill et al., 2005; Vakkila et Lotze, 2004).

De la même façon, le stress hypoxique favorise la nécrose intratumorale en stimulant l'activité de HIF (Hypoxia Inducible Factor) (Semenza, 2003). HIF stabilisé sous l'effet de la diminution en oxygène dans le milieu et par l'acidose, favorise alors la survie des cellules en stimulant la glycolyse, et en augmentant l'expression de gènes anti-apoptotiques. De plus, HIF favorise l'autophagie, en inhibant Akt (Bacon et Harris, 2004), et stimule la néovascularisation associée à la nécrose en augmentant l'expression de la protéine nécrotique Bnip3 (Kothari et al., 2003; Vande Velde et al., 2000).

L'ensemble de ces observations indique que les cellules cancéreuses inhibent l'apoptose et l'autophagie pour résister aux stress métaboliques et hypoxiques. Cette inhibition favorise cependant une réponse adaptative plus efficace encore par l'intermédiaire de la nécrose.

V.4. Réplication illimitée : « Un immortel n'est invincible que s'il apprend à protéger sa tête »

Contrairement aux conclusions réalisées par Alexis CARREL à la suite d'expériences effectuées sur des cultures de cellules *in vitro*; les capacités de multiplication des cellules sont finies, généralement atteintes après une soixantaine de cycles cellulaires (Hayflick et Moorhead, 1961), et ne sont pas renouvelées par les générations cellulaires suivantes. Le décompte des cycles est en effet lié à une « érosion » irréversible des télomères en raison de leur copie partielle au cours de la réplication. Cette particularité propre aux télomères, induit la réduction de leur taille, ce qui interfère avec les capacités de structuration des protéines télomériques et augmente les risques de fusions interchromosomiques. La détection de ces modifications structurales à l'extrémité des chromosomes engage en conséquence les voies de signalisation impliquant Rb et/ou p53 (Hara et al., 1991), qui provoquent généralement l'arrêt permanent de la prolifération cellulaire en basculant les cellules vers un état de sénescence, ou en éliminant les cellules par induction de l'apoptose. La réponse générée est dépendante du type cellulaire, ainsi que de l'ampleur des atteintes génomiques causées par le raccourcissement des télomères, mais l'induction de la sénescence, qui constitue généralement la réponse initiale à la déstabilisation des télomères, impose un arrêt définitif du cycle cellulaire. Lorsque les cellules poursuivent leurs divisions au-delà des limites imposées par la sénescence, elles développent une instabilité génomique caractérisée par la production de fusions télomériques qui dirige les cellules vers l'apoptose. L'origine du signal apoptotique reste encore mal définie, mais elle pourrait impliquer la signalisation classique des dommages à l'ADN, puisque les télomères déstructurés présentent des homologies avec les coupures simples brins, et que l'altération de la voie de réparation des dommages à l'ADN impliquant ATM et p53, empêche le développement de cette réponse apoptotique (Chin et al., 1999). Cette signalisation pourrait également être amplifiée par une contribution directe des protéines impliquées dans la structuration des télomères. Plus particulièrement, lorsque la protéine télomérique, TRF2, ne peut plus interagir avec les télomères, un signal de stress est transmis vers p53 (Karlseder et al., 1999).

En limitant le nombre de cycles cellulaires, les voies de signalisation de l'érosion télomérique s'opposent à la propagation de mutations somatiquement acquises, ce qui en fait un obstacle aux cancers. L'oncogénèse requiert en effet la réalisation de nombreux cycles cellulaires, puisque les lésions génomiques sont générées de façon stochastique, atteignent aussi bien les gènes favorables que les gènes défavorables à la prolifération cellulaire, et que des combinaisons de lésions doivent être sélectionnées (Loeb et al., 2003). C'est pourquoi, au cours de leur émergence, 90% des cancers retardent cette horloge en maintenant la longueur des télomères (Hastie et al., 1990). Deux types de stratégies de préservation des télomères ont été identifiés dans les cellules cancéreuses. Leur taille est entretenue par l'expression d'une télomérase, physiologiquement absente de la majorité des tissus, ou par un mécanisme de recombinaison (Counter et al., 1992).

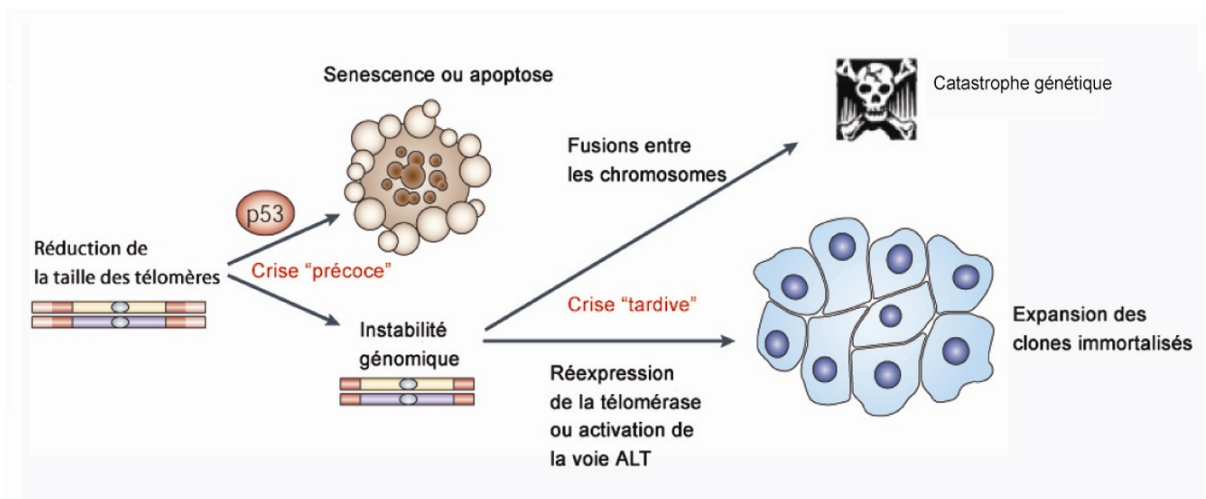


Figure 23. Etapes de sélection à l'origine de l'émergence de cellules cancéreuses présentant une capacité de réplication illimitée (Adaptée de Zhivotovsky 2005).

Schématiquement, l'acquisition de cette propriété résulte de deux phases de sélection (« crise précoce » et « crise tardive »). Lorsque les cellules invalident les mécanismes de la sénescence, elles s'exposent à une instabilité génomique associée à la déstructuration des télomères. Cette instabilité, normalement détectée, induit la mort des cellules par apoptose (« crise précoce ») (Zhang et al., 1999). En revanche, si les mécanismes de l'apoptose sont invalidés, l'instabilité génomique s'amplifie dans les tumeurs, favorisant d'une part la mutation des clones, mais rapprochant d'autre part, les cellules d'une phase de « crise tardive » appelée catastrophe génétique, au cours de laquelle la majorité des clones est éliminée. C'est à l'issue de cette phase que les clones « immortalisés » par le maintien des télomères pourraient être sélectionnés (Zhivotovsky et Kroemer, 2004). Il est intéressant de remarquer que l'inhibition de l'apoptose dans ce cas n'agit pas directement en augmentant la

résistance des clones à la mort cellulaire, mais qu'elle est à l'origine d'un processus de sélection des cellules immortalisées en favorisant l'occurrence de catastrophes génétiques.

V.5. Propriété métastatique des cancers : faire d'un itinéraire parsemé d'embûches, un voyage sans histoire

L'expansion des tumeurs au-delà de leur tissu primaire constitue un niveau d'évolution supplémentaire du cancer à l'origine de 90% des décès liés à cette maladie (Chambers et al., 2002; Sporn, 1996). La fatalité du stade métastatique des cancers s'explique à la fois par l'atteinte des fonctions de multiples organes, ainsi que par une insensibilité extrême des cellules cancéreuses aux thérapies classiques liée en partie, à une résistance encore accrue des cellules métastatiques à la mort cellulaire (Berezovskaya et al., 2005; Glinsky et al., 1997; Inbal et al., 1997). La formation de métastases peut être schématiquement divisée en trois stades. Les cellules se séparent tout d'abord de leur tissu d'origine, puis les clones passent dans le flux sanguin. Enfin, les cellules doivent s'implanter et former des colonies dans un tissu secondaire. Au cours de ces différentes étapes, les cellules cancéreuses modifient de façon importante la balance entre les signaux de survie et les signaux de mort cellulaires en développant une autonomie importante vis-à-vis des signaux de survie.

a) Détachement des cellules cancéreuses de leur matrice et des cellules avoisinantes

L'interaction des cellules avec leur tissu d'origine participe à la fois à leur maintien physique dans le tissu, et à la régulation de leur prolifération et de leur survie. A l'inverse, le détachement des cellules induit une mort cellulaire par apoptose appelée: anoïkis (Grossmann, 2002; Ruoslahti et Reed, 1994; Wang et al., 2003). L'induction de la mort cellulaire dans ce cas résulte d'une part de la privation des cellules des signaux de survie issus de leurs interactions avec leurs microenvironnements, et d'autre part de la stimulation de voies pro-apoptotiques. Parmi les protéines impliquées dans cette relation entre les cellules et leur microenvironnement, les molécules d'adhésion sont particulièrement importantes. Elles peuvent participer en effet à cette régulation à la manière de récepteurs à dépendance, en induisant des signaux favorisant la survie lorsqu'elles sont complexées à leur ligand, et des signaux de mort lorsque celui-ci est absent (Stupack, 2005). Par exemple, lorsqu'elles interagissent avec les protéines de la matrice, les FAK (Focal Adhésion Kinases) bloquent

l'apoptose par l'intermédiaire d'Akt, qui inhibe la caspase 8, ou de ERK, qui induit l'expression des IAP. En revanche, en absence de leur ligand, ces intégrines favorisent l'induction de l'apoptose en activant la caspase 8 (figure 24).

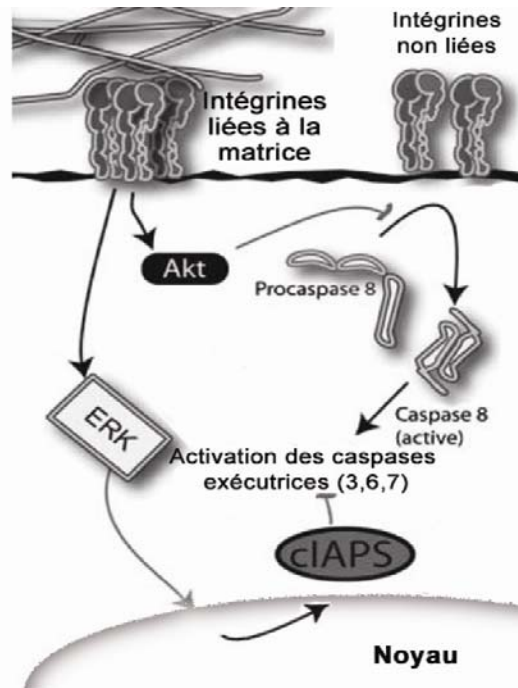


Figure 24. Voies de signalisation pro- et anti-apoptotiques induites par les intégrines (d'après Stupack, 2005).

L'expression des molécules d'adhésion est fréquemment dérégulée dans les cancers. Les cadhérines et les intégrines impliquées respectivement dans l'interaction des cellules avec les cellules voisines, et la matrice dans le tissu d'origine sont en effet sous-exprimées, alors que de nouveaux types de molécules d'adhésion sont produits (Raz et al., 1980). Ce changement dans le profil d'expression des molécules d'adhésion favorise par la suite la réimplantation métastatique en restaurant les signaux de survie.

Outre l'importance des signaux dépendants de l'adhésion, la cohérence tissulaire est également assurée par une signalisation paracrine liée aux facteurs de croissance. Ces facteurs sont généralement produits de façon hétérotypique, d'un type cellulaire pour un autre, et sont disponibles de façon très localisée dans les tissus. Ce type de signalisation empêche de cette façon, la dissémination des cellules en générant une dépendance intercellulaire dans un même tissu. Les cancers peuvent contourner cependant cette contrainte en produisant les facteurs de croissance de façon autocrine ainsi que leurs récepteurs. La surexpression du BDNF (Brain

Derived Neurotrophic Factor), et de son récepteur, trkB, permet notamment aux cellules épithéliales de survivre hors de leur matrice en stimulant les voies de survie dépendantes d'Akt (Douma et al., 2004).

Si le défaut de stimulation de ce type de récepteurs défavorise la survie, il n'induit pas directement la mort. La situation est toutefois différente dans le cas des récepteurs à dépendance. L'absence de stimulation par le ligand implique l'activation de la mort cellulaire dans ce cas, par exemple, en absence de Netrin-1, le récepteur DCC stimule l'apoptose par l'intermédiaire de la caspase 9 sans nécessiter l'activation de la voie apoptotique mitochondriale. Cette famille de récepteurs pourrait par conséquent jouer un rôle crucial dans le contrôle de l'activité métastatique. Cependant, les cellules cancéreuses inactivent fréquemment ce mécanisme homéostatique en réduisant, ou en inhibant la production de ces récepteurs (Mazelin et al., 2004; Mehlen, 2005; Mehlen et Fearon, 2004).

Indépendamment de ces mécanismes impliquant les signaux provenant du microenvironnement des cellules, l'altération physique de la structure des cellules provoquée par leur détachement, est à l'origine d'un stress intrinsèque qui met en jeu les protéines pro-apoptotiques Bim et Bmf. Ces membres à BH3 unique de la famille Bcl-2 contrôlent l'intégrité du cytosquelette en étant associées respectivement à l'actine et aux microtubules (Puthalakath et al., 1999; Puthalakath et al., 2001). La déstructuration du cytosquelette qui s'effectue au cours du détachement des cellules est à l'origine de la libération de Bim et Bmf dans le cytosol, où ils stimulent la voie apoptotique mitochondriale intrinsèque en inhibant Bcl-2 et Bcl-XL, et en activant Bax et Bak.

b) Intravasation

L'intravasation (entrée des cellules cancéreuses dans le flux sanguin), ajoute à la charge des signaux de stress deux types de contraintes liées aux stress mécaniques, et à l'exposition au système immunitaire. Dans le flux sanguin, les contraintes rhéologiques peuvent dégrader mécaniquement les cellules cancéreuses, cependant l'expérience démontre qu'elles sont également éliminées par apoptose (Glinsky et al., 1997). Cette observation pourrait expliquer que la capacité métastatique des cellules cancéreuses injectées dans le flux sanguin soit directement corrélée à leur degré de résistance à ce type de mort cellulaire. Les voies de transduction de ces signaux de stress sont actuellement mal définies, mais un exemple de régulation implique la production autocrine de la thrombospondine-1 par les cellules stressées, et l'induction de l'apoptose par l'intermédiaire du récepteur CD47 (Freyberg et al., 2000; Graf et al., 2003). Il est intéressant de noter que bien que les stress mécaniques puissent

induire l'apoptose ou une destruction physique des cellules, des voies de transduction des signaux de ces stress peuvent également associées avec des réponses anti-apoptotiques. Ainsi les turbulences du flux sanguin favorisent l'inhibition de l'apoptose dans les cellules endothéliales (Haga et al., 2003). L'exploitation de ces voies de signalisation par les cellules cancéreuses n'a cependant pas été étudiée.

Plus indirectement, les stress mécaniques stimulent la production d'oxyde nitrique par les cellules endothéliales dans certaines régions de la vascularisation soumises à de fortes contraintes rhéologiques (Ziegler et al., 1998). Or, ce radical oxygéné induit l'apoptose ou la nécrose en générant un stress oxydatif dans les cellules, ce qui pourrait expliquer l'absence de métastases au niveau de régions particulièrement turbulentes, et la prédisposition des organes présentant d'importants réseaux de capillaires sanguins (foie, poumons, os).

Enfin, le système immunitaire constitue un obstacle potentiel à la production de métastases (Jakobisiak et al., 2003). Les cellules cancéreuses peuvent en effet être repérées, et dégradées par les lymphocytes T ou NK circulants, lorsqu'elles surexpriment par exemple le récepteur CD95. L'implication du système immunitaire dans l'élimination des cellules cancéreuses métastatiques est cependant encore controversée. En effet, l'immunodéficiência ne semble pas contribuer de façon importante à la formation de métastases dans des modèles murins (Pardoll, 2003). En revanche, l'inactivation de la voie de apoptotique induite par TRAIL favorise l'oncogénèse (Cretney et al., 2002; Takeda et al., 2001).

VI. Thérapies anti-cancéreuses basées sur la mort cellulaire

VI.1. Implication de la mort cellulaire dans l'efficacité des thérapies conventionnelles

Les premières thérapies anticancéreuses apparaissent après la seconde guerre mondiale, avec l'observation des effets curatifs des moutardes à l'azote chez les soldats gazés atteints de leucémies. Cette découverte a ouvert la voie vers l'élaboration de thérapies visant à atteindre l'intégrité de l'ADN. Fondées sur ce principe, les radiothérapies ou les chimiothérapies basées sur l'utilisation de drogues génotoxiques, telles que la bléomycine, le cis-platine, ou le 5-fluorouracile, induisent un effet cytotoxique à l'origine de l'élimination des cellules cancéreuses. Il apparaît clairement que les processus de mort cellulaire, et plus particulièrement l'apoptose jouent un rôle déterminant dans l'efficacité de ces traitements, puisque la résistance des cancers à l'action de ces thérapies est corrélée au degré d'inhibition des voies pro-apoptotiques (Johnstone et al., 2002; Lowe et al., 1994; Rudner et al., 2001). On note notamment que la surexpression de la protéine anti-apoptotique, Bcl-2 réduit la

sensibilité des cellules cancéreuses à ces traitements (Gonzalez et al., 2001; Miyashita et Reed, 1993; Zong et al., 2004).

Ces thérapies anti-cancéreuses atteignent plus particulièrement les cellules proliférant de façon importante, c'est pourquoi les cellules tumorales y présentent une sensibilité plus importante que les cellules saines. Cependant, certains tissus sains sont également affectés par ces thérapies. Une immunodépression qui témoigne de l'atteinte des cellules hématopoïétiques accompagne notamment les cures de chimiothérapie (Searle et al., 1975). Malgré leurs effets secondaires, ces thérapies conventionnelles ont une bonne efficacité thérapeutique lorsque les cancers sont précocement traités. Leur efficacité est cependant très atténuée face à des cancers avancés. D'autre part, du fait de l'atteinte non-sélective du génome par ces traitements, leurs effets oncogéniques ne peuvent être exclus (Johnstone et al., 2002).

VI.2. De nouvelles stratégies impliquant les mécanismes de la mort cellulaire

C'est à la suite de découvertes effectuées dans les années 1980 concernant le fonctionnement moléculaire des cellules cancéreuses, que de nouvelles stratégies thérapeutiques plus ciblées palliant aux défauts des thérapies conventionnelles ont commencés à être envisagées (Debatin et al., 2002; Fulda et Debatin, 2006). Les thérapies anti-cancéreuses conventionnelles n'exploitent qu'un pendant de la mort cellulaire en stimulant ses mécanismes par l'endommagement des cellules. Cette exploitation de la mort cellulaire n'est pas optimale et d'autres voies sont à présent à explorer. Comme discuté précédemment, la mort cellulaire participe activement à l'homéostasie cellulaire. Le destin des cellules dépend effectivement d'un équilibre intégrant l'ensemble des signaux de survie et des signaux de mort provenant de leur microenvironnement ou générés de façon intrinsèque (Lowe et al., 2004; Raff, 1992).

Il en résulte que l'activation ou l'inhibition d'une voie de signalisation ne produit pas un effet net en termes de survie cellulaire, mais que sa contribution dépend du contexte cellulaire. «L'état de survie» des cellules dépend en quelque sorte de l'intégration de l'ensemble des contributions par rapport à un seuil d'activation de la mort cellulaire au dessous duquel les cellules s'autodétruisent. Cette conception est aujourd'hui fondamentale dans la compréhension des résistances des cancers, l'élaboration de nouvelles thérapies, et la sélectivité des traitements. C'est pourquoi, d'importants efforts sont développés afin de trouver les moyens de pousser « l'état de survie » des cellules cancéreuses vers le seuil de la mort cellulaire (Reed, 2006).

Plus concrètement, les cellules cancéreuses se trouvent dans un « état de survie » sensibilisé à la mort cellulaire. Globalement, les stress issus de l'oncogénèse augmentent la charge des contributions en faveur de la mort cellulaire. Dans les cellules cancéreuses, cet excédent de signaux de mort cellulaire est contrebalancé par l'augmentation des signaux de survie dans les cellules cancéreuses.

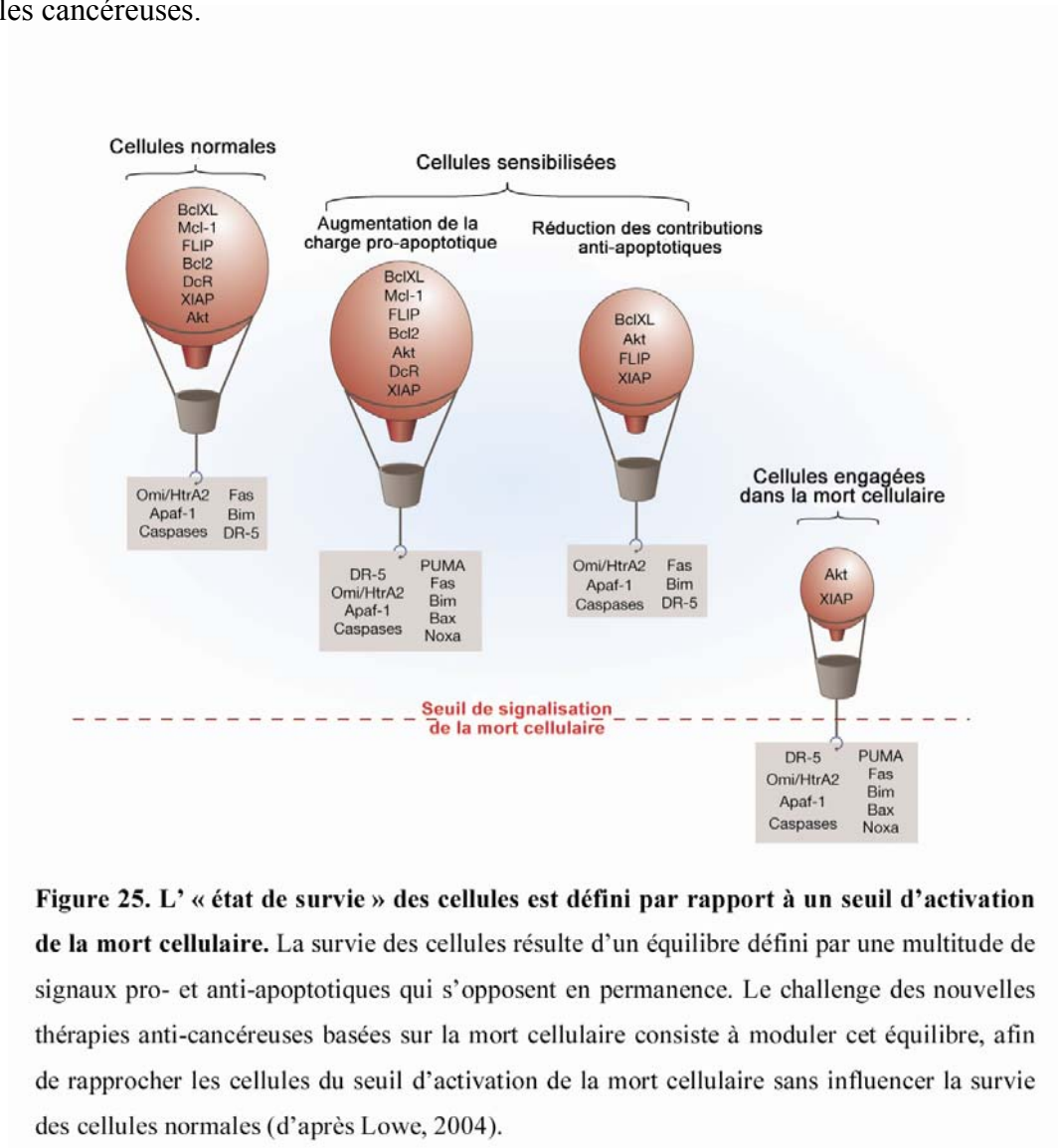


Figure 25. L'« état de survie » des cellules est défini par rapport à un seuil d'activation de la mort cellulaire. La survie des cellules résulte d'un équilibre défini par une multitude de signaux pro- et anti-apoptotiques qui s'opposent en permanence. Le challenge des nouvelles thérapies anti-cancéreuses basées sur la mort cellulaire consiste à moduler cet équilibre, afin de rapprocher les cellules du seuil d'activation de la mort cellulaire sans influencer la survie des cellules normales (d'après Lowe, 2004).

C'est pourquoi, de nouvelles thérapies en cours d'essai clinique visent à réduire les signaux de survie. Elles font intervenir par exemple le blocage de récepteurs aux facteurs de croissance par des anticorps monoclonaux, ou l'inhibition de kinases impliquées dans les voies de transduction des signaux de survie (Blume-Jensen et Hunter, 2001; Druker et al., 2001; Slamon et al., 2001). Bien que les cibles de ces agents thérapeutiques soient également présentes dans les cellules saines, la spécificité d'action de ces thérapies est probablement due à une dépendance importante des cellules cancéreuses vis-à-vis de ces voies de survie en raison de la surcharge en signaux de mort qu'elles génèrent.

D'autre part, la caractérisation moléculaire des acteurs de l'apoptose et la définition de leur rôle a permis de générer des inhibiteurs permettant de contrôler l'activité des protéines anti-apoptotiques (Juin et al., 2004). La fréquente surexpression de Bcl-2 dans les cellules cancéreuses est à l'origine d'une résistance à l'apoptose, à l'autophagie et à la nécrose (Amundson et al., 2000). Afin d'inhiber Bcl-2, plusieurs molécules capables bloquer son activité anti-apoptotique en interagissant avec son domaine BH3 sont aujourd'hui en phase préclinique. L'efficacité de cette stratégie est illustrée par les effets thérapeutiques du gossypol, un composé naturel dérivé des graines de coton, ou des peptides synthétiques (Manero et al., 2006; Oltersdorf et al., 2005; Van Poznak et al., 2001).

De même, les IAP constituent des cibles thérapeutiques d'intérêt puisque leur surexpression dans les cellules cancéreuses conduit à l'inhibition de l'étape exécutive de l'apoptose par les caspases (Grossman et al., 2001; Salvesen et Duckett, 2002). Le développement de molécules favorisant l'inhibition des IAP est encore précoce, mais des inhibiteurs chimiques ou des peptides mimant les sites de fixation des caspases ou des protéines antagonistes des IAP, HTRA2 ou SMAC, démontrent des effets cytotoxiques contre différents types de cellules cancéreuses en culture.

Des essais se concentrent également sur la régulation de l'expression génique dans les cellules cancéreuses. D'une part, des essais de thérapie génique basés sur des vecteurs viraux ont été réalisés afin de restaurer l'expression de tBid ou de p53 (Kazhdan et al., 2006; Roth, 2006). A l'inverse, la réduction de l'expression de Bcl-2 peut être réalisée grâce à un ARN antisens contre l'ARN messager de Bcl-2. Issu de cette stratégie, l'Oblimersen sodium est actuellement en phase III d'essai clinique, et démontre une grande efficacité contre les cancers de la prostate, les mélanomes et les leucémies myéloïdes (Reed, 2006).

Au-delà du rétablissement des voies intrinsèques de l'apoptose, les voies apoptotiques extrinsèques offrent également la possibilité d'accroître la charge des contributions pro-apoptiques. Plus particulièrement, TRAIL présente une activité anti-tumorale et n'induit pas d'inflammation profitable au cancer contrairement à d'autres cytokines (Luo et al., 2004). Des anticorps monoclonaux spécifiques du récepteur de TRAIL, en phase I d'essai clinique, permettent de réduire certaines tumeurs sans induire d'effets cytotoxiques secondaires (Ichikawa et al., 2001). La voie TRAIL / TRAIL-R permet l'induction d'une apoptose dépendante ou indépendante des mitochondries et ces traitements peuvent donc s'affranchir de la résistance liée à la surexpression de protéines anti-apoptotiques ce qui est probablement à l'origine des capacités thérapeutiques de ces traitements.

Les développements thérapeutiques anticancéreux associés à la modulation des processus de mort cellulaire constituent un exemple remarquable de la complémentarité entre la recherche fondamentale et la recherche appliquée. Après 40 ans d'essais thérapeutiques contre le cancer, les stratégies conventionnelles basées sur des attaques frontales et physiques contre les cellules cancéreuses sont en cours d'évolution vers des stratégies plus subtiles et spécifiques issues de la rationalisation du fonctionnement moléculaire des cancers et des mécanismes physiologiques impliqués dans l'homéostasie cellulaire. Bien que ces nouvelles stratégies soient encore expérimentales, elles présentent un potentiel thérapeutique contre le cancer qui, en combinaison avec les techniques de caractérisation moléculaire et génétique des tumeurs, pourrait permettre de traiter de façon appropriée la plupart des cancers. C'est dans le but de contribuer à la compréhension du fonctionnement des mécanismes qui régulent la mort cellulaire, et dans l'espoir de pouvoir participer à l'effort thérapeutique issu de ce champ d'investigations que l'étude de l'activité cytotoxique de la mitogaligine a été entreprise.

Première partie : Caractérisation des effets de la mitogaligine sur des membranes lipidiques

I. Introduction

L'intervention des protéines de la famille Bcl-2, Bax et tBid, dans la déstabilisation de la membrane mitochondriale est intensivement étudiée en raison de la participation de ces protéines dans l'induction la mort cellulaire sous l'effet de multiples stress. Les mécanismes de perméabilisation employés par ces protéines impliquent tantôt la régulation de l'ouverture du PTP, tantôt leurs actions sur la partie lipidique de la membrane mitochondriale externe. Bax peut effectivement former des pores dans les membranes en s'oligomérisant (Antonsson et al., 2000), et tBid perméabilise les mitochondries par l'intermédiaire de son interaction avec un phospholipide anionique spécifique des membranes mitochondriales: la cardiolipine (Gonzalvez et al., 2005). Les capacités d'interaction de Bax ou de tBid avec les membranes sont probablement liées à leurs homologies de structure avec des toxines bactériennes capables de perméabiliser des membranes. A l'image de ces protéines, la mitogaligine induit la fuite de cytochrome c à partir de cellules transfectées ou de mitochondries isolées (Duneau et al., 2005). Afin de caractériser les mécanismes employés par la mitogaligine pour perméabiliser la mitochondrie, ses interactions avec des membranes lipidiques et ses capacités de déstabilisation membranaires ont été évaluées.

II. Matériel et méthodes

II.1. Synthèse peptidique

Les peptides couvrant les différentes régions de la mitogaligine ont été synthétisés en utilisant la méthode standard sur résine 9-fluorenyl methoxycarbonyl (Fmoc). Les peptides ont été assemblés sur cette résine à l'aide d'un synthétiseur Perkin Elmer Applied Biosystem 431A puis décrochés par un mélange d'acide trifluoroacétique (82,5%), et une mixture d'anti-oxydants (thioanisole 5%, éthanedithiol 2.5%, phenol 5%, et de l'eau 5%). Les chaînes latérales ont été protégées par du 2,2,4,6,7 pentaméthyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl (pour les arginines), du t-butyl (pour les sérines et thréonines) ou du tert-butylloxycarbonyl (pour les

tryptophanes). Les peptides ont ensuite été purifiés par HPLC par phase inverse sur une colonne semi-préparative C18 puis analysés par spectroscopie de masse MALDI-TOF.

II.2. Préparation de liposomes

Les liposomes ont été préparés par évaporation en phase inverse (Szoka et Papahadjopoulos, 1978). Les quantités adéquates de lipides en solution dans du chloroforme ont été prélevées. Le ratio de phospholipides utilisé est de 20/1 dans le cas des liposomes neutres constitués de phosphatidylcholine (PC) et de cholestérol (Chol) respectivement. Les liposomes anioniques ont été préparés avec les ratios lipidiques suivants : phospholipide anionique / PC / Chol (10/10/1). Les phospholipides mono-anioniques utilisés sont la phosphatidylsérine (PS), le phosphatidylinositol (PI), le phosphatidylglycerol (PG) ou l'acide phosphatidique (PA). Lorsque les phospholipides di-anioniques, la cardiolipine (CDL) ou la cytidine diphosphate diacylglycerol (CDP-DAG), ont été utilisés, un ratio de 5/10/1 a été employé afin de conserver une densité de charge équivalente à celle obtenue dans le cas des liposomes anioniques constitués de phospholipides mono-anioniques. Le solvant a été évaporé sous vide à 35°C pendant 20 minutes. Le film lipidique ainsi obtenu a ensuite été dissout dans 3 volumes d'éther fraîchement lavé et 1 volume de Tris-Hcl 100 mM, NaCl 136 mM, pH 7.4. Une émulsion stable a été générée par sonication dans un bain à ultrasons à température ambiante pendant une minute (6 fois 10 secondes). L'éther a ensuite été évaporé sur un bloc chauffant à 35°C pendant 20 minutes jusqu'à obtention d'un gel. Les liposomes ont été formés après avoir vigoureusement vortexé le gel. L'élimination des lipides non incorporés, ainsi que de l'éther résiduel a été effectuée après dilution de l'échantillon au centième dans du Tris-Hcl 100 mM, NaCl 136 mM, Ph 7.4 et ultracentrifugation à 25000 rpm pendant 1 heure à 4°C. Le culot de liposomes a finalement été resuspendu dans Tris-Hcl 100 mM, NaCl 136 mM, Ph 7.4 et les phospholipides ont été dosés.

II.3. Dosage des phospholipides

Le dosage est basé sur la détermination de la concentration en phosphates (PO_4^{2-}) selon la méthode de Zhou et Arthur (Zhou et Arthur, 1992). Elle consiste en la formation d'un complexe coloré entre le phosphomolybdate et le vert de malachite. Dans une première étape 2 µl de la solution à doser ont été digérés à 160°C en présence de 100 µl d'acide perchlorique dans des tubes de pyrex étanches. Au cours de la digestion, une coloration jaune se développe, puis disparaît lorsque la digestion est complète. Après refroidissement, 300 µl de tampon Tris-Hcl 100 mM, NaCl 136 mM, pH 7,4 et 2 ml d'une solution contenant 1,5% de tween 20

et un ratio 1:3 molybdate d'ammonium (4,2% dans HCl) / vert de malachite (0,3% dans H₂O bi-distillée) ont été ajoutés à l'échantillon. Le mélange a été incubé pendant un minimum d'une demi-heure à température ambiante avant de mesurer l'absorbance à 660 nm. La concentration en phosphates a été calculée à partir de la valeur de l'absorbance et d'une droite d'étalonnage réalisée à partir d'une gamme de KH₂PO₄ de 0 à 3 µg. La concentration calculée correspond directement à la concentration en phospholipides dans le cas des liposomes PC :Chol, PC :PS :Chol, PC :PI :Chol, PC :PA :Chol et PC :PG :Chol. Un facteur de correction de 2/3 doit cependant être introduit dans le cas des liposomes PC : CDL : Chol et PC : CDP-DAG :Chol en raison de la présence de deux phosphates par molécules de cardiolipine ou de CDP-DAG.

II.4. Test de perméabilisation des liposomes

a) Encapsulation d'inuline tritiée dans les liposomes

Afin d'obtenir des liposomes contenant de l'inuline tritiée (³H) Inulin Amersham, 250 µCi, activité spécifique : 0,63 Ci/mmol) dans leur compartiment aqueux, 0,9 µl de marqueur radioactif (3 nmol) ont été ajoutés au volume de Tris-Hcl 100 mM, NaCl 136 mM, pH 7,4 au cours de la préparation des liposomes. Après la rupture du gel, le marqueur non-encapsulé a été séparé des liposomes par ultracentrifugation à 25000 rpm/min, pendant une heure à 4°C dans des tubes de 12 ml. Le taux moyen d'encapsulation est dans ces conditions de 14% (+/- 5%). Les liposomes dans le culot ont ensuite été resuspendus dans 100 µl de tampon Tris-Hcl 100 mM, NaCl 136 mM, pH 7,4 et les phospholipides sont dosés.

b) Test de fuite

Pour chaque composition membranaire, les effets des peptides dérivés de la mitogaline ont été évalués. La Dermaseptine S3, un peptide antimicrobien déstabilisateur de membranes (Moll et al., 2000), a été employé en tant que témoin positif et a permis de valider le fonctionnement des systèmes. Des liposomes seuls ont été incubés dans les mêmes conditions, ils constituent les témoins négatifs en permettant d'évaluer le taux de fuite spontanée de l'inuline tritiée depuis les liposomes. Les peptides ont été incubés avec les liposomes de différentes compositions, contenant de l'inuline tritiée pendant 1 heure à 4°C pour des ratios molaires P/L ([peptide]/[lipides]) croissants, la concentration en phospholipides ayant été maintenue constante.

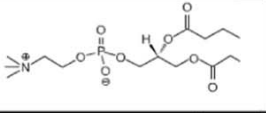
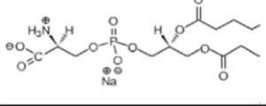
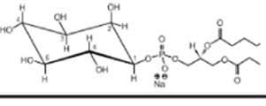
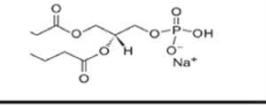
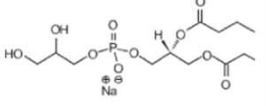
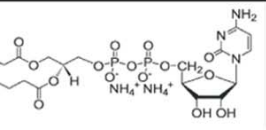
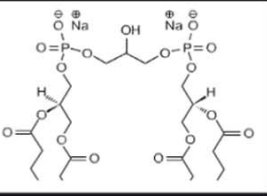
Phospholipide	Têtes polaires	Charge à pH neutre
Phosphatidylcholine (PC)		0
Phosphatidylsérine (PS)		-1
Phosphatidylinositol (PI)		-1
Acide phosphatidique (PA)		-1
Phosphatidylglycérol (PG)		-1
Cytidine diphosphate diacylglycérol (CDP-DAG)		-2
Cardiolipine (CDL)		-2

Figure 26. Charge et structure des têtes polaires des phospholipides constituant les liposomes.

Le marqueur libéré a été séparé des liposomes par ultracentrifugation à 25000 rpm/min pendant 1 heure à 4°C. Après resuspension du culot, 500 µl de surnageant et 500 µl de culot ont été mélangés à 1 ml de scintillant. La radioactivité a été mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation (Liquid Scintillation Analyser, Packard, Rungis, France). Les taux de fuite ont été calculés à partir de la radioactivité contenue dans les liposomes récupérés dans le culot rapportée à la radioactivité totale contenue dans le volume d'incubation initial.

II.5. Titration des peptides dérivés de la mitogaligine par des liposomes par spectroscopie de fluorescence

L'interaction des peptides dérivés de la mitogaligine avec les différents liposomes a été étudiée par spectroscopie de fluorescence du tryptophane (Ladokhin et al., 2000). Les liposomes utilisés dans cette étude ont été synthétisés par hydratation de film lipidique. Une

cuvette de quartz de 5 x 5 mm a été utilisée. En raison de l'interaction des peptides avec les parois de la cuvette et son bouchon, ceux-ci ont été préalablement traités dans un bain de polyéthylèneimine 1% pendant 1 heure, puis rincés à l'eau bi-distillée. L'inhibition de l'interaction du peptide avec les parois a été validée par l'absence de variation de l'intensité de fluorescence du spectre des peptides après 15 min passées dans la cuvette sans agitation. Des quantités croissantes de liposomes ont été ajoutées à 0,2 μ M de peptide dans 600 μ l de tampon Tris-HCl 100 mM, NaCl 136 mM, pH 7,4. Après chaque addition, le mélange a été réalisé en renversant 3 fois la cuvette. Les spectres d'émission des tryptophanes ont été acquis entre 290 et 400 nm avec un pas de 2 nm et un temps d'intégration de 0,4 s en réponse à une excitation à 280 nm à l'aide d'un spectrofluorimètre FluoroMax-2 (Jobin Yvon-Spex). Les spectres des liposomes seuls ont également été acquis pour chaque concentration en phospholipides (L). Après avoir soustrait les contributions spectrales issues des liposomes, les spectres ont été lissés et la longueur d'onde d'intensité maximale (λ_{max}) a été extraite en utilisant le logiciel ORIGIN 6.0. La position de λ_{max} a été rapportée en fonction du ratio molaire [peptide]/[phospholipides] (P/L).

Les coefficients de partition des peptides ont été déterminés à partir des isothermes d'interaction comme il est décrit à partir de l'équation (Pouny et al., 1992):

$$X_b = K_p \cdot C_f$$

X_b correspond au ratio molaire de peptide lié sur la quantité totale de lipides, K_p est le coefficient de partition et C_f , la concentration de peptide libre à l'équilibre.

La concentration en peptide lié a été déterminée à partir du déplacement de la longueur du λ_{max} selon l'équation :

$$f_b = (\lambda_0 - \lambda) / (\lambda_0 - \lambda_\infty)$$

f_b est la fraction de peptide lié. λ_0 , λ et λ_∞ , sont respectivement la longueur d'onde d'émission maximale de fluorescence enregistrée lorsque le peptide est libre en absence de liposomes, en présence de liposomes ou lorsque tout le peptide est lié (Beschiaschvili et Seelig, 1990).

II.6. Extinction de fluorescence par l'acrylamide

Cette méthode a été utilisée afin d'évaluer l'exposition des tryptophanes des peptides dérivés de la mitogaligine au solvant, après leur interaction avec les liposomes. Les peptides seuls ou en présence de différentes préparations de liposomes ont été incubés en présence de concentrations croissantes d'acrylamide (Acrylamide 29:1, Bio-Rad laboratories). Les tryptophanes ont été excités à 295 nm, et les spectres d'émission de fluorescence enregistrés entre 290 et 450 nm, puis les contributions provenant de l'acrylamide et des liposomes ont été soustraites. Le ratio (F_0/F) entre l'intensité de fluorescence enregistrée en absence (F_0) ou en présence d'acrylamide (F) est rapporté en fonction de la concentration en acrylamide ($[Q]$). Les constantes d'extinction ont été déterminées selon la méthode décrite par (Eftink et Ghiron, 1976). L'équation classique de Stern-Volmer a été appliquée à l'extinction de fluorescence collisionnelle. Les résultats impliquant l'extinction statique de fluorescence ont été analysés en utilisant la forme modifiée de cette équation.

- Equation classique de Stern-Volmer:

$$F_0 / F = 1 + [Q]K_{sv}(\text{eff})$$

- Equation modifiée de Stern-Volmer :

$$F_0 / F e^{V[Q]} = 1 + [Q]K_{sv}(\text{eff})$$

Dans les deux cas, F_0 et F sont les intensités maximales d'émission de fluorescence détectées en présence ou en absence d'acrylamide. $[Q]$ correspond à la concentration d'acrylamide et V est un paramètre lié au volume environnant le fluorophore et à la probabilité de extinction statique. Enfin, puisque le peptide considéré par cette expérience contient plusieurs tryptophanes, la constante de extinction est une constante effective: $K_{sv}(\text{eff})$.

II.7. Turbidimétrie

Les cinétiques d'agrégation des liposomes sous l'effet des peptides dérivés de la mitogaligine ont été acquises par la mesure de la densité optique à 436 nm pendant 15 minutes d'incubation à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible Varian Cary 100 (Persson et al., 2001). Différents ratios P/L ont été explorés en augmentant la concentration en peptide

pour une concentration en phospholipides constante (100 μM). Les valeurs de la densité optique sont indiquées en fonction du ratio molaire [peptide]/[lipides] (P/L). Les mélanges ont été réalisés dans une cuvette de 120 μl avec un trajet optique de 1 cm.

II.8. Agrégation mitochondriale

Des mitochondries de cellules HeLa ont été spécifiquement marquées au MitoTracker® Red (Molecular Probes Inc., Eugene, OR) après incubation des cellules pendant 45 min à 37°C dans 10 ml de milieu de culture contenant 75 nM du marqueur fluorescent.

Les mitochondries ont ensuite été extraites selon le protocole suivant:

- Incubation de 20×10^6 de cellules dans 2 ml de tampon de lyse (sucrose 250 mM, EDTA 1 mM, HEPES 20 mM, MgCl_2 1,5 mM, KCl 10 mM, cocktail inhibiteur des protéases 1‰ (Sigma Aldrich), PMSF (100mM) 1‰, DTT (1M) 1‰), 30 min à 4°C, suivie d'une étape de pottérisation (30 fois).
- séparation des membranes et des cellules non lysées par centrifugation à 400g pendant 5 minutes à 4°C.
- centrifugation du surnageant à 15000g pendant 30 minutes
- resuspension du culot mitochondrial dans 50 μl de tampon de lyse.

L'observation a été réalisée par microscopie de fluorescence à 598 nm immédiatement après avoir mélangé 1 μl de la préparation mitochondriale à 1 μl de peptide sur une lame. Dans chaque cas la concentration finale en peptide est de 400 μM . Le témoin a été réalisé en ajoutant 1 μl de tampon de lyse à 1 μl de la préparation mitochondriale.

L'agrégation des mitochondries a également été quantifiée par turbidimétrie en mesurant la densité optique à 436 nm. Les mitochondries ont été incubées avec des concentrations croissantes de peptide à 4°C pendant 30 minutes dans un volume final de 20 μl . Après incubation, 100 μl de tampon de lyse ont été ajoutés et la densité optique a été mesurée. Les résultats sont exprimés pour chaque concentration de peptide en pourcentage d'augmentation de la densité optique par rapport à la densité optique mesurée pour les mitochondries seules incubées dans le tampon de lyse.

II.9. Transformation de levures

- Les souches de levures :

Les souches utilisées dans cette étude ont été fournies par le Docteur Peter Polčic (Université de Comenius, Bratislava, Slovaquie) et leurs phénotypes sont publiés dans la littérature (Polcic et al., 2005). Brièvement, le gène de la cardiolipine synthase a été délété dans la souche Δ CRD. Ce mutant ne produit plus de cardiolipine. La souche Δ PGS ne produit ni cardiolipine, ni phosphatidylglycérol en raison de la délétion du gène de la phosphatidylglycérol synthase.

- Transformation des levures

Une colonie issue de chaque souche a été cultivée pendant 48 heures à 30°C dans 5 ml de milieu complet YPD (Yeast Peptone Dextrose, Qbiogene), puis les levures ont été remises en culture pendant 4 heures dans 50 ml à une densité optique à 600 nm de 0.3. Les cellules ont ensuite été culotées et ont été resuspendues dans 25 ml d'eau ultra-pure. Après une nouvelle centrifugation, les levures ont été remises en suspension dans 2 ml d'un tampon contenant 10 mM de Tris-Hcl, 1 mM d'EDTA et 100 mM LiAC à pH 7.5 pendant 10 minutes à température ambiante.

100 μ l de cellules ont été mélangés à 10 μ l d'ADN de sperme de saumon (10 mg/ml) et 1 μ g de plasmide (PYES-LS). 700 μ l d'une solution de PEG 3350 à 40% dans 10mM de Tris-Hcl, 1mM d'EDTA, 100 mM LiAC à pH 7.5 ont ensuite été ajoutés. Ce mélange a été incubé pendant 7 minutes à 42°C puis les cellules ont été centrifugées, et ont été remises en suspension dans 1 ml de tampon Tris-Hcl 10 mM, EDTA 1 mM à pH 7.5. Après une dernière centrifugation, les cellules sont resuspendues de ce même tampon et 100 μ l de cellules ont été étalés sur un milieu sélectif gélosé (YNB (Yeast Nitrogen Base, Qbiogene), CSM-URA (Bio 100 Inc.), 2% glucose (Sigma-Aldrich), 1,5% agar). Les levures ont été mises en culture dans une étuve à 30°C jusqu'à apparition des colonies.

- Induction de l'expression du plasmide

Une colonie issue de chaque souche transformée a étéensemencée dans un milieu sélectif (YNB (Yeast Nitrogen Base, Qbiogene), CSM-URA (Bio 100 Inc.), 2% galactose (Sigma-Aldrich)) pendant 48 heures afin d'induire l'expression de la protéine. Un aliquote de chaque culture a été prélevé et a été observé par microscopie visible et par microscopie de fluorescence (excitation à 488nm et détection à 520 nm).

III. Résultats

III.1. Les peptides dérivés de la mitogaligine avec des membranes lipidiques

La production de la mitogaligine recombinante est difficile. Ceci est probablement lié à son caractère à la fois très cationique et très hydrophobe. Par conséquent, afin d'évaluer les capacités d'interaction de la mitogaligine avec des membranes lipidiques, une stratégie basée sur l'utilisation de peptides synthétiques couvrant différentes régions de la protéine a été développée. Trois peptides dont la séquence et la position occupée dans la mitogaligine sont indiquées dans la figure 27 ont été synthétisés. Le peptide MG 12-34 correspond à la partie N-terminale de la mitogaligine, le peptide MG 31-53 couvre l'intégralité de la séquence d'adressage mitochondrial de la protéine et le peptide MG 55-75 s'étend sur une partie de l'extrémité C-terminale de la mitogaligine.

A)



B)

Peptide	MG 12-34	MG 31-53	MG 55-75
Charge nette à pH neutre	+5	+5	+5
Nombre de tryptophanes	1	3	3

Figure 27. Peptides dérivés de la mitogaligine. A) Séquence des peptides et leur position dans la mitogaligine, la séquence d'adressage mitochondrial de la protéine est surlignée en rouge. B) Charge des peptides et leur contenu en tryptophanes.

Tous les peptides sont cationiques, et contiennent au minimum un tryptophane. Les propriétés de fluorescence de cet acide aminé ont été utilisées afin de suivre l'interaction de ces peptides avec différents types de liposomes. En effet, l'émission de fluorescence des tryptophanes est influencée par la polarité de leur environnement.

a) Interaction avec des membranes contenant de la cardiolipine

Dans un premier temps, les peptides ont été incubés avec des quantités croissantes de liposomes neutres constitués de phosphatidylcholine (PC) et de cholestérol (CHOL) ou de liposomes anioniques contenant de la cardiolipine (CDL), de la phosphatidylcholine et du cholestérol, et leur interaction a été suivie par spectroscopie de fluorescence des tryptophanes. Le déplacement de la longueur d'onde d'émission maximale de fluorescence des tryptophanes (λ_{max}) vers les courtes longueurs d'ondes, en reflétant le passage des peptides d'un milieu polaire (tampon) vers un milieu apolaire (membranes lipidiques), permet en effet de détecter leurs interactions avec les membranes.

Lorsque les peptides sont incubés en présence de quantités croissantes de liposomes neutres contenant de la phosphatidylcholine et du cholestérol, aucun changement de la position de la λ_{max} n'est enregistré, ce qui traduit l'absence d'interaction entre les peptides et ces membranes neutres (non montré).

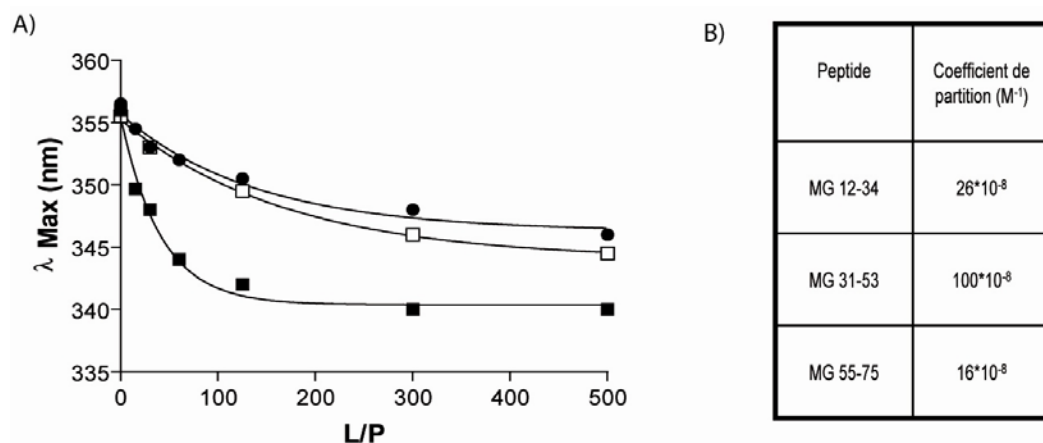


Figure 28. Interaction des peptides dérivés de la séquence sauvage de la mitogaligine avec des liposomes anioniques contenant de la cardiolipine. Les mesures ont été effectuées par spectroscopie de fluorescence en incubant des concentrations croissantes de liposomes (L) avec les différents peptides en concentration constante (P). A) le déplacement de la longueur d'onde d'émission maximale de fluorescence (λ_{max}) est représenté en fonction du ratio molaire lipide sur peptide (L/P). MG 12-34 : \square , MG 31-53 : \blacksquare , et MG 55-75 : \bullet . B) La valeur numérique du coefficient de partition de chaque peptide est indiquée.

Un déplacement de la λ_{max} est en revanche détecté pour chaque peptide dérivé de la mitogaligine, incubé en présence de quantités croissantes de liposomes anioniques contenant de la cardiolipine (figure 28.A). Ce résultat indique que les peptides peuvent interagir avec ce phospholipide. Cependant, les peptides présentent des affinités différentes pour ce type de

membrane. En effet, le peptide MG 31-53 interagit avec l'affinité la plus importante pour les liposomes contenant de la cardiolipine, son coefficient de partition est respectivement 4 fois et 6 fois plus important que celui de MG 12-34 et MG 55-75 pour ces liposomes (figure 28.B). Bien que tous les peptides puissent interagir avec des liposomes contenant de la cardiolipine, il est important de remarquer que le peptide MG 31-53, contient la séquence d'adressage mitochondrial de la mitogaligine, et présente l'affinité la plus importante pour ces membranes. Ce résultat laisse penser que l'interaction de cette région de la mitogaligine avec la cardiolipine puisse contribuer de façon importante à l'adressage mitochondrial de la mitogaligine.

b) Une interaction dépendante de contributions électrostatiques

Afin de déterminer les bases moléculaires de l'interaction entre le peptide MG 31-53 et la cardiolipine, le rôle des contributions électrostatiques a été évalué à travers l'utilisation de peptides dérivés de sa séquence possédant des charges globales réduites (figure 29). Le peptide MG 35-53 qui est raccourci de l'extrémité N-terminale du peptide MG 31-53, comporte une charge globale de +4 à pH neutre. Ce peptide interagit avec les liposomes contenant de la cardiolipine. Cependant, son affinité pour ces membranes est diminuée d'environ 2 fois en comparaison avec celle du peptide MG 31-53 (figure 30.A, B).

Peptide	Séquence	Charge nette à pH neutre
MG 31-53	31 RGLSWTGTSRRLPWSTWLSRST 53	+5
MG 31-53 RR/AA	31 RGLSWTGTS AA LPWSTWLSRST 53	+3
MG 35-53	35 WTGTSRRLPWSTWLSRST 53	+4
MG 35-53 S/E	35 WTGT E RRLPWSTWLSRST 53	+3
MG 35-53 TS/EE	35 WTG EE RRLPWSTWLSRST 53	+2

Figure 29. Séquence et charge des peptides mutés dérivés du peptide MG 31-53.

Les substitutions phosphomimétiques introduites dans les peptides MG 35-53 S/E et TS/EE en remplaçant une sérine ou une sérine et une thréonine par des glutamates réduisent la charge globale de ces peptides à + 3 et +2 respectivement. Leur affinité pour les liposomes contenant de la cardiolipine est plus réduite que celle du peptide MG 35-53. L'interaction du peptide MG 35-53 S/E avec ces liposomes est en effet 14 fois plus faible que celle du peptide MG 31-53 (figure 30.B). L'affinité du peptide MG 35-53 TS/EE est inférieure à celle du peptide MG 35-53 S/E, mais ne peut être déterminée selon la méthode employée. Enfin, le doublet

d'arginines R40R41 a été substitué par des alanines dans le peptide MG 31-53 RR/AA. En conséquence, la charge de ce peptide est réduite à +3. Bien que ce peptide comporte la même charge globale que le peptide MG 35-53 S/E, aucun changement du λ_{max} n'a pu être détecté (figure 30.A).

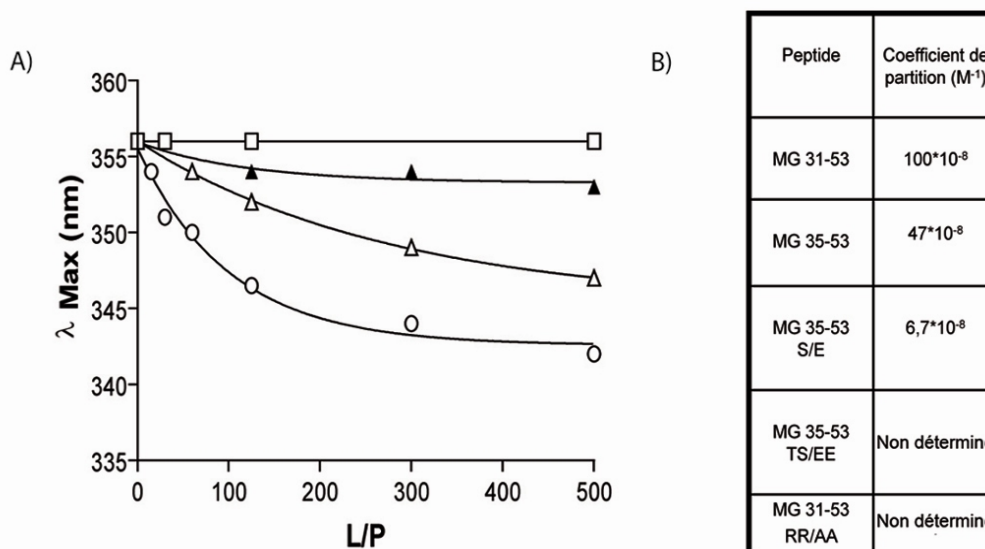


Figure 30. Contributions des charges à l'interaction du peptide MG 31-53 avec les liposomes anioniques contenant de la cardioline.

a) Les peptides MG 31-53 RR/AA : □, MG 35-53 : ○, MG 35-53 S/E : △, et MG 35-53 TS/EE : ▲, ont été incubés en présence de concentrations croissantes de liposomes contenant de la cardioline (L). Les spectres de fluorescence issus des tryptophanes de ces peptides ont été acquis pour des concentrations croissantes de lipides, la concentration en peptide est maintenue constante (P). A) le déplacement de la longueur d'onde d'émission maximale de fluorescence (λ_{max}) est représenté en fonction du ratio molaire lipide sur peptide (L/P). B) La valeur numérique du coefficient de partition de chaque peptide est indiquée.

L'interaction de ce peptide avec des liposomes contenant de la cardioline est complètement inhibée par la substitution du doublet d'arginine. Ces résultats indiquent que la charge positive globale du peptide MG 31-53 lui permet d'interagir avec la cardioline, cependant, les charges portées par le doublet d'arginines en position 40 et 41 de la mitogaline contribuent de la façon la plus importante à l'interaction.

c) Evaluation de l'insertion membranaire des tryptophanes

L'émission de fluorescence des tryptophanes est très sensible aux collisions intermoléculaires. Ce phénomène à l'origine de la dispersion d'une partie de l'énergie photonique accumulée par leur cycle aromatique sous forme de chaleur, se traduit par une

extinction de la fluorescence émise par ces acides aminés. L'acrylamide provoque notamment l'extinction de la fluorescence des tryptophanes, c'est pourquoi il est utilisé dans un test permettant d'évaluer l'accessibilité de ces acides aminés (Eftink et Ghiron, 1976). En effet, lorsque les tryptophanes sont très exposés au solvant, leur émission de fluorescence est très réduite en présence d'acrylamide. Alors que si les cycles aromatiques des tryptophanes participent à l'interaction avec des membranes, en y étant insérés, l'émission de fluorescence n'est pas altérée en présence d'acrylamide.

L'émission de fluorescence du peptide MG 31-53 en solution dans le tampon en absence de liposomes présente une extinction très sensible à l'acrylamide. L'extinction est tout d'abord linéaire, puis, elle devient exponentielle pour des concentrations plus importantes d'acrylamide (figure 31.A). Ce profil d'extinction, classiquement obtenu lorsque les collisions deviennent plus fréquentes que l'émission de photons, indique que les tryptophanes sont très exposés au solvant dans ce cas (Coefficient d'extinction = 8.1 M^{-1}).

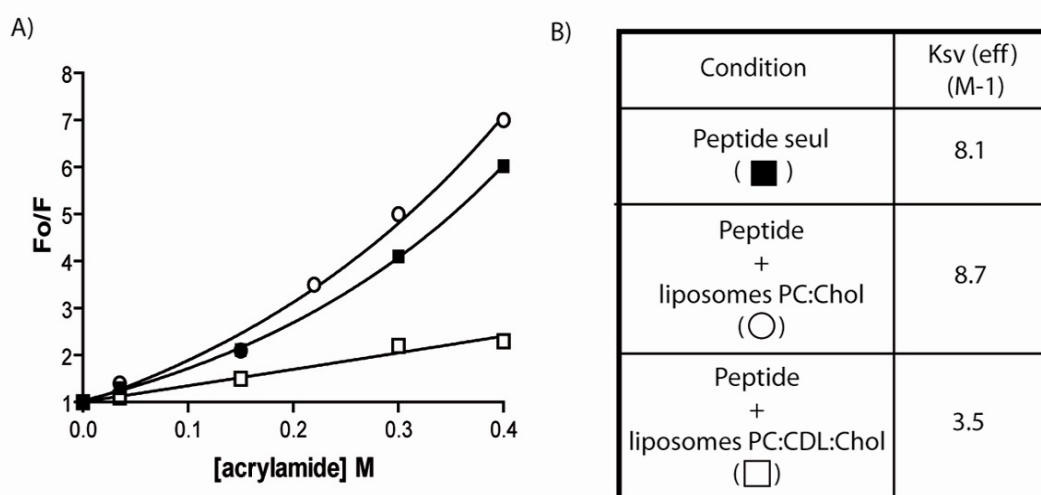


Figure 31. Quenching de fluorescence à l'acrylamide. A) Des concentrations croissantes d'acrylamide ont été ajoutées au peptide MG 31-53 en absence ■ ou en présence de liposomes constitués de PC :Chol ○ ou de PC :CDL :Chol □ à un ratio L/P=100. L'intensité de fluorescence issue des tryptophanes du peptide a été mesurée. F_0/F , qui représente le rapport entre l'intensité de fluorescence maximale en absence (F_0) et en présence d'acrylamide (F) respectivement, est reporté en fonction de la concentration en acrylamide (M). B) Les constantes d'extinction de fluorescence ($K_{sv}(\text{eff})$) sont indiquées dans le tableau dans chaque cas.

Un profil très similaire est obtenu lorsque le peptide est placé dans une solution contenant des liposomes neutres constitués de phosphatidylcholine et de cholestérol. Le coefficient d'extinction de 8.7 M^{-1} calculé dans ce cas (figure 31.B), reflète une exposition

importante des cycles aromatiques des tryptophanes au solvant ce qui est en accord avec l'absence d'interaction entre le peptide MG 31-53 et les liposomes neutres.

Lorsque le peptide est incubé en présence de liposomes contenant de la cardiolipine, la sensibilité de l'émission de fluorescence des tryptophanes aux collisions avec l'acrylamide est très réduite. En effet, la fluorescence décroît faiblement, et de façon linéaire avec l'augmentation de la concentration en acrylamide, le coefficient d'extinction est dans ce cas de $3,5 \text{ M}^{-1}$, ce qui indique que les tryptophanes sont peu accessibles au solvant (figure 31.A,B). Ce résultat indique que les tryptophanes du peptide MG 31-53 participent à probablement l'interaction par des contributions hydrophobes en étant insérés dans la membrane lipidique.

d) Interaction du peptide MG 31-53 avec différents phospholipides anioniques

Dans une seconde série d'expériences, l'interaction du peptide MG 31-53 avec des liposomes contenant différents types de phospholipides anioniques a été évaluée par spectroscopie de fluorescence des tryptophanes. On note tout d'abord qu'un déplacement du λ_{max} est observé avec tous les types de liposomes anioniques à l'exception de ceux contenant de la phosphatidylsérine (figure 32 A). L'affinité du peptide pour ces membranes est cependant réduite en comparaison avec son affinité pour les liposomes contenant de la cardiolipine. En effet, l'interaction du peptide pour les liposomes contenant du CDP-DAG, du PA, du PG ou du PI est respectivement 3 fois, 3.5 fois, 5.5 fois et 7.7 fois inférieure à l'affinité mesurée pour les liposomes contenant de la cardiolipine (figure 32.B).

Le peptide MG 31-53 peut interagir avec différents phospholipides anioniques ce qui indique qu'il n'interagit pas spécifiquement avec la cardiolipine, mais qu'il présente une spécificité basée sur les charges pour les membranes anioniques. Toutefois, d'autres paramètres sont à considérer dans l'interaction. Son affinité est en effet plus importante pour les membranes contenant de la cardiolipine ou ses précurseurs (CDP-DAG, PA, PG). L'accessibilité des charges des têtes polaires des phospholipides, leur capacité à favoriser l'insertion du peptide dans les membranes, ainsi que les contributions hydrophobes à l'interaction sont probablement à l'origine de ces différences (Ladokhin et White, 2001; Matsuzaki et al., 1998).

II.2. Les peptides dérivés de la mitogaline déstabilisent des membranes contenant de la cardioline

a) Perméabilisation de liposomes

Afin d'évaluer les capacités de perméabilisation membranaire de la mitogaline, les peptides dérivés de la protéine ont été incubés en concentrations croissantes avec des liposomes contenant de l'inuline tritiée, et la fuite de ce marqueur radioactif a été quantifiée (figure 33).

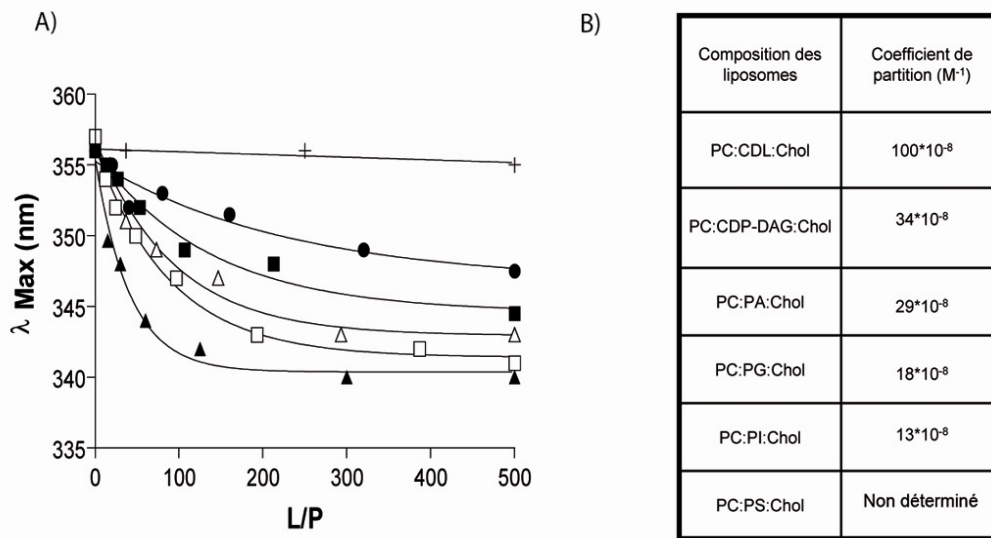


Figure 32. Titration du peptide MG 31-53 en présence de liposomes constitués de différents phospholipides anioniques. Le peptide MG 31-53 a été incubé avec des quantités croissantes de liposomes anioniques (L) contenant de la cardioline ▲, du CDP-DAG □, du PA ▲, du PG ■, du PI ● ou de la PS +. A) Le déplacement de la longueur d'onde d'émission maximale de fluorescence (λ_{max}) est représenté en fonction du ratio molaire lipide sur peptide (L/P). La concentration en peptide est constante. B) Les coefficients de partition du peptide en présence des différents types de liposomes sont indiqués.

Aucun relargage d'inuline n'est détecté lorsque les peptides sont incubés avec des liposomes zwitterioniques constitués de phosphatidylcholine et de cholestérol (non montré). En revanche, les peptides induisent une fuite du marqueur à partir de liposomes anioniques formés de phosphatidylcholine, de cardioline et de cholestérol. Le peptide MG 12-34 n'induit pas de fuite significative du marqueur ce qui indique que ce peptide ne perméabilise pas efficacement les liposomes contenant de la cardioline, bien qu'il puisse interagir avec ce type de membranes. Le peptide MG 55-75 induit cependant une fuite croissante du marqueur, de façon linéaire en fonction du ratio peptide sur lipide (P/L). Le peptide MG 31-53 présente l'activité perméabilisatrice la plus efficace. Le profil de fuite du marqueur en fonction du ratio

P/L est très différent de celui observé pour le peptide MG 55-75, ce qui suggère que le mécanisme à l'origine de la perméabilisation des liposomes par ces peptides soient différents. Le peptide MG 31-53 semble en effet perméabiliser les liposomes de façon « coopérative ». La fuite du marqueur débute à partir d'un ratio P/L de 0.05, puis atteint un plateau pour un maximum de 80 % de fuite pour un ratio P/L de 0.15 puis atteint un plateau. Cette caractéristique pourrait indiquer qu'une quantité critique de peptides par liposomes soit nécessaire à induire la perméabilisation de liposomes contenant de la cardiolipine.

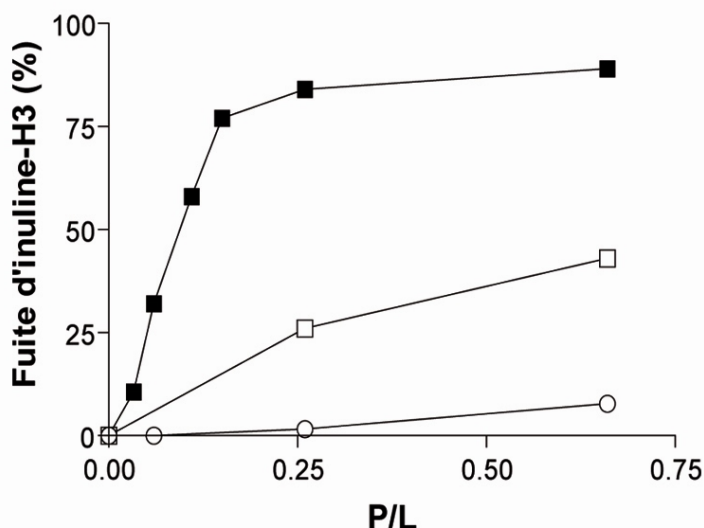


Figure 33. Perméabilisation de liposomes contenant de la cardiolipine par les peptides dérivés de la mitogaline. Une quantité constante de liposomes (L) constitués de PC :CDL :Chol et contenant de l'inuline tritiée dans leur volume encapsulé, a été incubée en présence de concentrations molaires croissantes (P) de MG 12-34 : ○, MG 31-53 : ■, MG 55-75 : □. Le taux de fuite du marqueur radioactif est indiqué en fonction du ratio molaire peptide / lipide (P/L).

b) Agrégation des liposomes

L'intégrité des liposomes a également été déterminée par l'évaluation de leur état d'agrégation. Les processus d'agrégation s'accompagnent d'une augmentation de l'opacité des solutions, ce processus peut par conséquent a été suivi par mesure de la densité optique à 436 nm (figure 34).

Aucune variation de la densité optique n'est détectée lorsque les différents peptides sont incubés en concentrations croissantes avec des liposomes neutres constitués de phosphatidylcholine et de cholestérol (non montré). Le même résultat est obtenu lorsque les peptides MG12-34 et MG 55-75 sont incubés avec des liposomes anioniques contenant de la cardiolipine ce qui indique que ces peptides n'agrègent ni les liposomes neutres, ni les liposomes anioniques dans ces conditions expérimentales. Une augmentation importante de la

densité optique est cependant enregistrée lorsque le peptide MG 31-53 est incubé avec les liposomes contenant de la cardiolipine. Cette agrégation s'effectue parallèlement à la perméabilisation des liposomes puisqu'elle débute pour un ratio P/L de 0.07, et est croissante avec les ratios molaires peptide sur lipides (P/L).

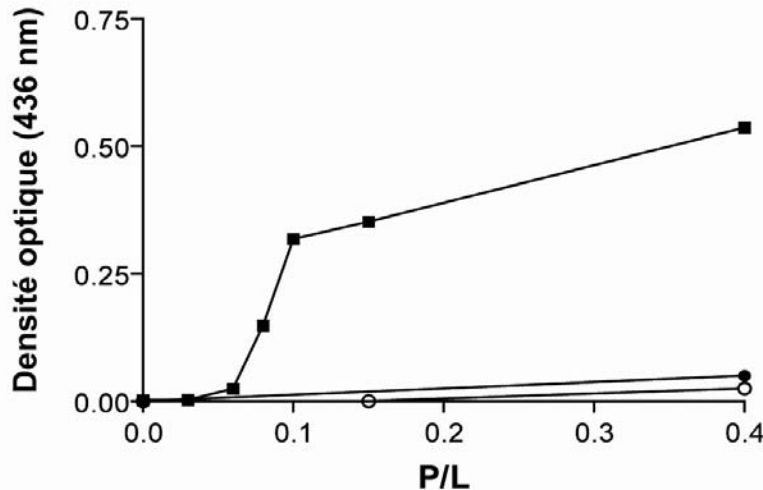


Figure 34. Agrégation des liposomes induite par les peptides dérivés de la mitogaligine.

Des concentrations croissantes (P) des peptides : MG 12-34 : ●, MG 31-53 : ■, ou MG 55-75 : ○ ont été incubées avec une quantité constante de liposomes constitués de PC :CDL :Chol et la densité optique des solutions a été déterminée. Les valeurs de la densité optique à 436 nm sont reportées en fonction du ratio molaire Peptide (P) / Lipides (L).

c) Agrégation de mitochondries isolées

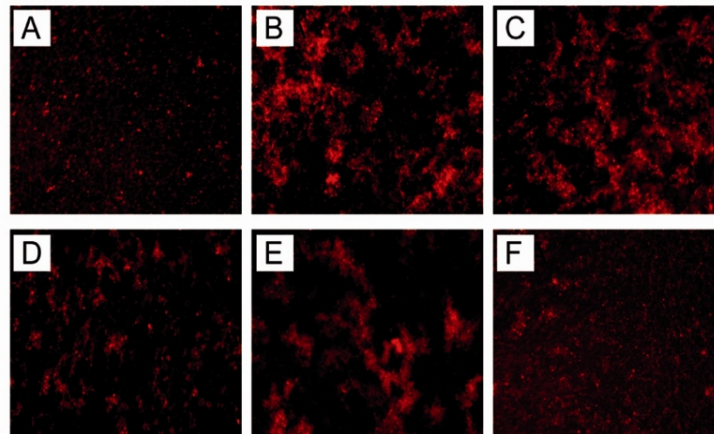
L'agrégation des mitochondries a pu être observée par microscopie de fluorescence, et a été quantifiée par turbidimétrie (figure 35.a,b). Les peptides ont tout d'abord été incubés avec des mitochondries isolées marquées au Mitotracker Red, puis ont été observées par microscopie de fluorescence.

Les mitochondries isolées apparaissent sous la forme de points fluorescents répartis de façon homogène dans leur tampon d'extraction. En présence du peptide MG 31-53, les mitochondries forment des agrégats fluorescents qui apparaissent de façon immédiate après l'addition du peptide. Cette activité est plus réduite pour le peptide MG 35-53, et n'est pas observée lorsque les mitochondries sont incubées avec le peptide MG 35-53 TS/EE ce qui est en accord avec l'affinité respective de ces peptides pour les membranes contenant de la cardiolipine (figure 30.A,B). Le peptide MG 12-34 induit une agrégation plus modérée que le peptide MG 31-53, alors que le peptide MG 55-75 provoque une agrégation importante des mitochondries.

Afin de quantifier ces différences, l'agrégation a également été détectée par turbidimétrie. Les mesures indiquent que le peptide MG 31-53 est le plus efficace dans l'agrégation des

mitochondries isolées. Curieusement, le peptide MG 55-75 présente une activité d'agrégation intermédiaire, alors qu'il n'agrège pas les liposomes contenant de la cardiolipine (figure 34).

a)



b)

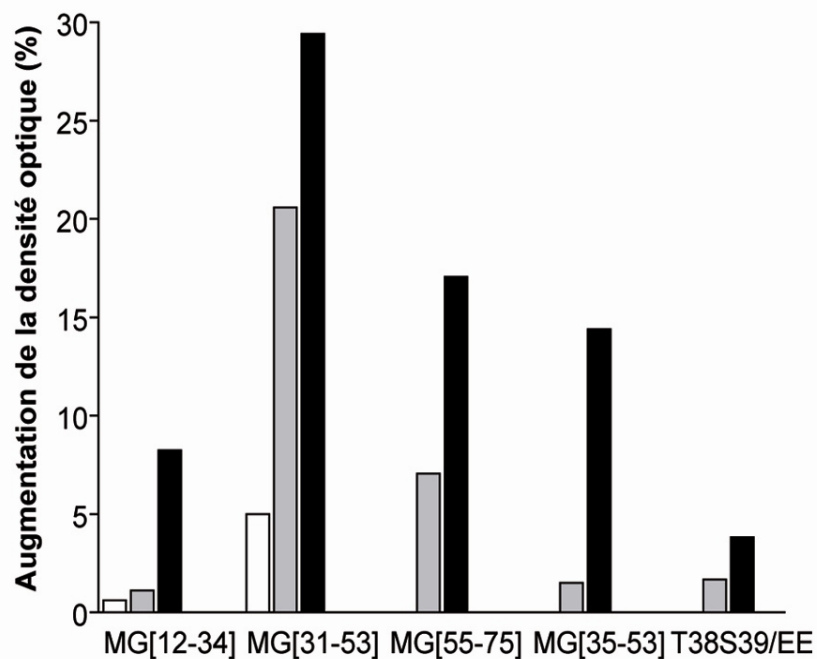


Figure 35. Agrégation de mitochondries isolées par les peptides dérivés de la mitogaligine. a) Des mitochondries isolées marquées au MitoTracker Red ont été incubées en absence (A) ou en présence de 400 μM de différents peptides (B,C,D,E,F). B : MG 31-53, C : MG 35-53, D : MG 12-34, E : MG 55-75 et F: MG 35-53 TS/EE.

b) L'agrégation des mitochondries a été quantifiée par turbidimétrie. Une quantité constante de mitochondries a été placée au contact de concentrations croissantes de peptides (du blanc vers le noir : 63 μM , 125 μM , 250 μM) et la densité optique des solutions a été mesurée.

Le peptide MG 12-34 est le moins efficace des peptides dérivés de la séquence sauvage de la mitogaligine. Les peptides MG 35-53 et MG 35-53 TS/EE agrègent beaucoup moins efficacement les mitochondries que le peptide MG 31-53 dont ils sont dérivés. Ces résultats sont en accord avec les observations réalisées par microscopie de fluorescence ainsi que les affinités respectives de ces peptides pour des liposomes contenant de la cardiolipine.

III.3. Adressage de la mitogaligine dans des levures déficientes en cardiolipine

Les résultats précédents démontrent que les peptides dérivés de la mitogaligine peuvent interagir avec des membranes anioniques. Plus particulièrement, le peptide MG 31-53, qui contient la séquence d'adressage mitochondrial de la mitogaligine, présente l'affinité la plus importante pour la cardiolipine et ces précurseurs. Ces résultats *in vitro* laissent penser que l'adressage de la mitogaligine vers la mitochondrie puisse être réalisé par son interaction avec la cardiolipine. Pour tester plus en avant cette hypothèse, l'adressage de la mitogaligine dans des souches de levures sauvages ou déficientes en cardiolipine (Δ CRD) ou en cardiolipine et en phosphatidylglycérol (Δ PGS) a été déterminé (figure 36).

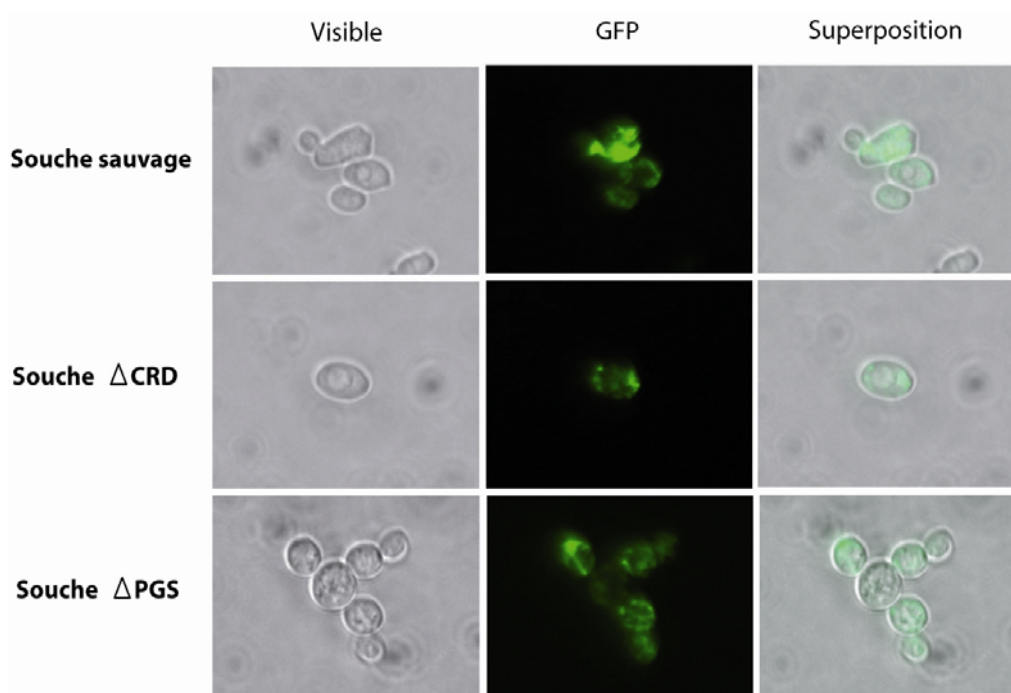


Figure 36. Localisation de la mitogaligine dans des levures transformées. La mitogaligine fusionnée à la GFP a été exprimée dans des levures sauvages ou des levures déficientes en cardiolipine (Δ CRD) ou en cardiolipine et en phosphatidylglycérol (Δ PGS). Les cellules ont été observées par microscopie visible et par microscopie de fluorescence.

Ces souches ont été transformées par un plasmide codant pour une protéine de fusion entre la mitogaligine et la GFP à son extrémité C-terminale, et la localisation de la protéine a été déterminée par microscopie de fluorescence. Dans la souche sauvage, la mitogaligine est localisée à la périphérie du noyau dans un réseau ponctiforme caractéristique des mitochondries. D'autre part, la même localisation est observée dans les souches mutantes Δ CRD et Δ PGS, ce qui indique que l'absence de cardiolipine ou de cardiolipine et de phosphatidylglycérol n'influence pas l'adressage de la mitogaligine dans ce modèle cellulaire. Toutefois, il doit être rappelé que les phospholipides anioniques jouent des rôles importants dans la cellule (Buckland et Wilton, 2000; Jiang et al., 2000). C'est pourquoi, les précurseurs de la cardiolipine, ou du phosphatidylglycérol peuvent se substituer à ces phospholipides afin de maintenir le fonctionnement physiologique des cellules (Chang et al., 1998; Chang et al., 1998; Kikuchi et al., 2000; Ohtsuka et al., 1993). Nous avons démontré que le peptide MG 31-53 pouvait interagir avec différentes espèces de phospholipides anioniques, telles que le CDP-DAG ou le PA, qui sont les précurseurs de la cardiolipine et du phosphatidylglycérol. En conséquence, il ne peut être exclu que ces phospholipides compensent l'absence de cardiolipine, et/ou de phosphatidylglycérol dans les levures mutantes, et assurent dans ces conditions l'adressage mitochondrial de la mitogaligine.

IV. Publication

Destabilization of Membranes Containing Cardiolipin or Its precursors by Peptides Derived from Mitogaligin, a Cell Death Protein.

Patrick Gonzalez, Mélanie Duneau, Stéphane Charpentier, Thierry Normand, Lucile Mollet, Martine Dubois, and Alain Legrand.

Biochemistry, Sous Presse.

1 Destabilization of Membranes Containing Cardiolipin or Its Precursors by Peptides
 2 Derived from Mitogaligin, a Cell Death Protein[†]

3 Patrick Gonzalez, Mélanie Duneau, Stéphane Charpentier, Thierry Normand, Lucile Mollet, Martine Dubois, and
 4 Alain Legrand*

5 Centre de Biophysique Moléculaire (Affiliated with the University of Orleans), CNRS UPR4301, Rue Charles Sadron,
 6 45071 Orleans Cedex 2, France

7 Received January 31, 2007; Revised Manuscript Received April 30, 2007

8 ABSTRACT: *Galig*, a gene embedded within the galectin-3 gene, induces cell death when transfected in
 9 human cells. This death is associated with cell shrinkage, nuclei condensation, and aggregation of
 10 mitochondria. *Galig* contains two different overlapping open reading frames encoding two unrelated
 11 proteins. Previous observations have shown that one of these proteins, named mitogaligin, binds to
 12 mitochondria and promotes the release of cytochrome *c*. However, the mechanism of action of this cytotoxic
 13 protein remains still obscure. The present study provides evidence that synthetic peptides enclosing the
 14 mitochondrial localization signal of mitogaligin bind to anionic biological membranes leading to membrane
 15 destabilization, aggregation, and content leakage of mitochondria or liposomes. This binding to anionic
 16 phospholipids is the most efficient when cardiolipin, a specific phospholipid of mitochondria, is inserted
 17 in the membranes. Thus, cardiolipin may constitute a target of choice for mitogaligin sorting and membrane
 18 destabilization activity.

19 Programmed cell death is a crucial process controlling
 20 normal development, cellular homeostasis, tissue renewing,
 21 and elimination of neoplastic cells. The essential role of
 22 mitochondria in mediating programmed cell death has now
 23 been clearly established. Releasing of death-promoting
 24 factors from the intermembrane space of mitochondria
 25 constitutes a key step, leading subsequently to caspase's
 26 cascade activation (1–3). Members of the Bcl-2 protein
 27 family control mitochondria homeostasis and are the most
 28 well-defined regulators of the apoptotic mitochondrial path-
 29 way (4). Among these proteins, proapoptotic members, such
 30 as Bid and Bax or Bad and Bak, trigger this mitochondrial
 31 pathway while others, such as Bcl-2 or Bcl-XL, inhibit
 32 apoptosis in preventing release of soluble proteins from the
 33 intermembrane space. Recently, we have identified an
 34 internal gene in the human galectin-3 locus as a new cell
 35 death inducer gene (5). This gene, named *galig* (galectin-3
 36 internal gene), contains two different overlapping reading
 37 frames and encodes two unrelated proteins (6). These proteins
 38 are distinct from galectin-3. *Galig* expression causes mor-
 39 phological alterations in human cells, such as cell shrinkage,
 40 cytoplasm vacuolization, nuclei condensation, and ultimately
 41 cell death. These alterations are associated with aggregation
 42 of mitochondria and extramitochondrial release of cyto-
 43 chrome *c*. Although not related to the Bcl-2 family, we have
 44 shown that *galig* coexpression with Bcl-xL is protective
 45 against cytochrome *c* release, suggesting a common pathway

46 between the cytotoxic activity of *galig* and the antiapoptotic
 47 activity of Bcl-xL. This antagonism was not observed upon
 48 cotransfection of Bcl-2 and *galig* (5).

49 Previous observations have led to the conclusion that
 50 mitogaligin, one of the proteins encoded by *galig*, binds to
 51 mitochondria and promotes the release of cytochrome *c*.
 52 Mitogaligin is a 97 amino acid protein, highly cationic and
 53 exceptionally rich in tryptophan residues (12%). Structure–
 54 activity relationship experiments showed that the mitochon-
 55 drial addressing of mitogaligin relies on an internal sequence,
 56 which is required for the cytosolic release of cytochrome *c*
 57 (5). Moreover, incubation of isolated mitochondria with
 58 peptides derived from mitogaligin induces cytochrome *c*
 59 release. However, the mechanism of action of mitogaligin
 60 leading to mitochondria permeability remains still obscure.
 61 The present results provide evidence that peptides derived
 62 from mitogaligin induce membrane aggregation and content
 63 leakage of mitochondria and anionic liposomes. This study
 64 supports a model in which mitogaligin would interact, in
 65 vivo, with cardiolipin, an anionic phospholipid of the
 66 mitochondrial membrane.

67 EXPERIMENTAL PROCEDURES

68 *Expression Vectors and Cell Transfections.* pMG3154-
 69 EGFP is a plasmid encoding amino acids 31–54 of mito-
 70 galigin fused to the EGFP coding sequence (5). Vectors
 71 encoding truncated forms of this fusion protein were gener-
 72 ated by inverse PCR. Deletions were performed to remove
 73 one amino acid at a time starting from the N- or C-terminal
 74 ends of the mitogaligin sequence. Plasmids were checked
 75 by sequencing and transfected into HeLa cells (ATCC, CCL-

[†] This work was supported by grants from the Comités Département
 aux d'Eure-et-Loir et du Cher de La Ligue Nationale Contre le Cancer.
 P.G. and M.D. are supported by fellowships from the Ministère de
 l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. P.G. is also supported
 by a fellowship from the Association pour la Recherche sur le Cancer.
 * To whom correspondence should be addressed. Tel: (33) 2 38 25
 55 36. Fax: (33) 2 38 25 78 07. E-mail: legrand@cns-orleans.fr.

B Gonzalez et al.

Biochemistry

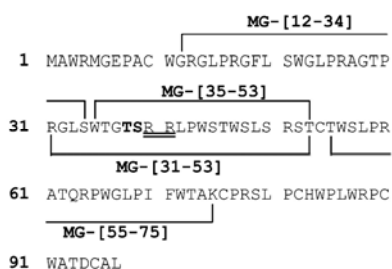


FIGURE 1: Sequences of mitogalgin and of derived synthetic peptides. Substitution of residues in bold (T38 and/or S39) with glutamate (E) in peptide MG-[35-53] generated peptides S39/E and T38S39/EE. Substitution of residues double underlined (R40 and R41) with alanines (A) generated peptide R40R41/AA.

76 2) using DNA-poly(ethylenimine) complexes (PEI)¹ (7) as
77 described (6). Twenty-four hours after transfection, cells were
78 incubated at 37 °C for 10 min with 0.1 µg/mL tetramethyl-
79 rhodamine ethyl ester (TMRM; Sigma). This specific mito-
80 chondrial marker is sensitive to the potential membrane. Cells
81 were washed with cell culture medium and analyzed by
82 fluorescence microscopy using fluorescein filters (excitation
83 at 488 nm and detection at 520 nm for EGFP) and rhodamine
84 filters (excitation at 543 nm and detection 590 nm for
85 TMRM).

86 *Release of Cytochrome c into the Cytosol of Transiently*
87 *Transfected HeLa Cells.* Twenty-four hours after transfection,
88 cells were checked by fluorescence microscopy for EGFP
89 fusion protein production and localization. Then, cells were
90 washed twice with PBS and incubated on ice in 250 µL of
91 hypotonic lysis buffer (250 mM sucrose, 10 mM KCl, 1.5
92 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 20 mM HEPES) supplemented
93 with a cocktail of protease inhibitors (Sigma Aldrich), 1 M
94 dithiothreitol, and 100 mM phenylmethanesulfonyl fluoride
95 for 30 min. After homogenization in a Dounce homogenizer,
96 homogenates were centrifuged at 15000g for 30 min. The
97 pellets were incubated for 20 min on ice with 5 µL of 10%
98 saponin and then suspended in 250 µL of lysis buffer. The
99 suspension was centrifuged at 15000g for 10 min, and the
100 protein concentration was estimated by the method of
101 Bradford. The resulting supernatants were analyzed by
102 immunoblotting for detection of cytochrome c using a murine
103 monoclonal anti-cytochrome c antibody (1:250) (clone
104 7H8.2C12; Pharmingen, BD Biosciences, France) followed
105 by horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:
106 5000). The protein was detected with the ECL detection
107 system (BM chemiluminescence western blotting kit; Roche
108 Diagnostic) according to the manufacturer's instructions.

109 *Synthesis of Mitogalgin-Derived Peptides.* Peptides cover-
110 ing different regions of mitogalgin were synthesized (see
111 sequences in Figure 1). A standard 9-fluorenylmethoxycar-
112 bonyl (Fmoc) solid-phase method was used. Peptides were
113 assembled on an Fmoc-Rink amide aminomethyl resin using
114 a Perkin-Elmer Applied Biosystems 431A synthesizer and
115 subsequently cleaved from the resin with trifluoroacetic acid

¹ Abbreviations: PEI, poly(ethylenimine); Fmoc, 9-fluorenylmethoxycarbonyl; PC, phosphatidylcholine; Chol, cholesterol; PS, phosphatidylserine; PI, phosphatidylinositol; PG, phosphatidylglycerol; PA, phosphatidic acid; CDP-DAG, cytidine diphosphate diacylglycerol; K_p, partition coefficient; K_{SV}(eff), Stern-Volmer constant.

(82.5%) and a mixture of scavengers (thioanisole, 5%;
ethanedithiol, 2.5%; phenol, 5%; and water, 5%) (8). Side
chains were protected by 2,2,4,6,7-pentamethylidihydroben-
zofuran-5-sulfonyl (Arg) or *tert*-butyl (Ser and Thr) or *tert*-
butyloxycarbonyl (Trp). Peptides were purified to homoge-
neity by high-performance liquid chromatography using a
semipreparative C18 reverse-phase column. Identities of the
synthetic peptides were confirmed by MALDI-TOF mass
spectrometry (9).

Preparation of Liposomes. All liposomes were prepared
by reverse-phase evaporation. Briefly, lipids were dissolved
in chloroform. The following ratios were used for zwitter-
ionic liposomes: 20/1 for phosphatidylcholine (PC) and
cholesterol (Chol), respectively.

Anionic liposomes were prepared with the following
ratio: anionic phospholipid/PC/Chol (10/10/1). Anionic
phospholipids used were phosphatidylserine (PS), phosphati-
dylinositol (PI), phosphatidylglycerol (PG), or phosphatidic
acid (PA). For anionic liposomes containing cardiolipin or
cytidine diphosphate diacylglycerol (CDP-DAG), a ratio of
5/10/1 was used. This different ratio is necessary to get the
same amount of charges for an equal concentration of total
lipids. Chloroform was evaporated under vacuum. The lipid
film was dissolved in 3 volumes of water-washed ether and
1 volume of 100 mM Tris and 136 mM NaCl, pH 7.4. Stable
emulsion was obtained by sonication at room temperature.
Ether was then evaporated for 20 min at 35 °C until obtaining
a gel. Liposomes were formed after thoroughly vortexing
of the gel. Separation of unincorporated lipids and residual
ether was performed after dilution of the sample with 100
volumes of Tris buffer and ultracentrifugation at 25000 rpm
for 1 h at 4 °C. Pelleted liposomes were resuspended in 100
mM Tris and 136 mM NaCl, pH 7.4.

Phospholipid Quantification. The total amount of lipids
was determined upon quantification of the phosphate concen-
tration by malachite green (10).

Binding of Peptides to Liposomes. All synthetic peptides
contain at least one tryptophan residue, allowing monitoring
of peptide transfer from the polar buffer to the membrane
complex interface through the blue shift of fluorescence
spectra (λ_{max} shift) (11). Increasing amounts of liposomes
were added to a constant concentration of peptide (0.2 µM)
in 100 mM Tris and 136 mM NaCl, pH 7.4. Tryptophans
were excited at 280 nm, and fluorescence emission spectra
were acquired between 290 and 450 nm on a FluoroMax-2
spectrofluorometer (Jobin Yvon-Spex). Quartz cuvettes (5
× 5 mm) and caps were precoated by 1% PEI during 1 h at
room temperature in order to avoid peptide binding to cuvette
walls. Background due to buffer and liposomes was sub-
tracted with ORIGIN 6.0. The maximum emission wave-
length (λ_{max}) was plotted as a function of lipid/peptide molar
ratio. A decrease in λ_{max} (i.e., blue shift) indicates peptide
binding to liposomes. Binding isotherms and partition
coefficients were calculated as described (12).

Determination of Partition Coefficients. Partition coef-
ficients were calculated as described (12). Briefly, binding
isotherms were analyzed as a partition equilibrium using X_b
= K_pC_f, where X_b is the molar ratio of bound peptide per
total lipid, K_p is the partition coefficient, and C_f is the
concentration of free peptide at equilibrium. The fraction of
bound peptide was calculated using f_b = (λ - λ₀)/(λ_∞ - λ₀).
λ, λ₀, and λ_∞ are the wavelengths of maximum emission of

Biochemistry

178 fluorescence of bound peptide, free peptide, and peptide at
 179 saturation, respectively. X_b was then calculated using $P_T f_b$,
 180 where P_T is the total concentration of peptide and corrected
 181 as described by Beschiaschvili (13). X_b was plotted as a
 182 function of concentration of free peptide (C_f). The partition
 183 coefficient corresponds to the initial slope of the curve.

184 *Acrylamide Fluorescence Quenching.* This method was
 185 used to determine exposure of tryptophans of mitogaligin-
 186 derived peptides to solvent upon interaction with liposomes
 187 (14). Peptides, alone or in the presence of different liposome
 188 preparations, were incubated with increasing concentrations
 189 of acrylamide. Tryptophans were excited at 295 nm, and
 190 fluorescence emission spectra were obtained from 290 to 450
 191 nm. Background related to buffer, acrylamide, and liposomes
 192 was subtracted. The ratio between fluorescence intensity
 193 without quencher (F_0) and fluorescence intensity in the
 194 presence of acrylamide quencher (F) was plotted against
 195 acrylamide concentration. The Stern–Volmer collisional
 196 quenching coefficient was determined as described (14) using
 197 the equation $F_0/F = 1 + K_{SV}(\text{eff})[Q]$ for collisional quench-
 198 ing, where $K_{SV}(\text{eff})$ is the Stern–Volmer quenching effective
 199 constant and $[Q]$ is the concentration of the quencher. To
 200 take into account a static contribution to quenching, the
 201 modified Stern–Volmer equation was applied (14): $F_0/F e^{V[Q]} = 1 + K_{SV}(\text{eff})[Q]$, where V is the static constant.

202
 203 *Peptide-Induced Aggregation of Liposomes.* Aggregation
 204 of liposomes in the presence of peptides was measured after
 205 15 min incubation by turbidimetry at 436 nm (15) with a
 206 UV–visible Varian Cary spectrometer. The maximum ab-
 207 sorbance value was plotted as a function of peptide/
 208 phospholipid molar ratio.

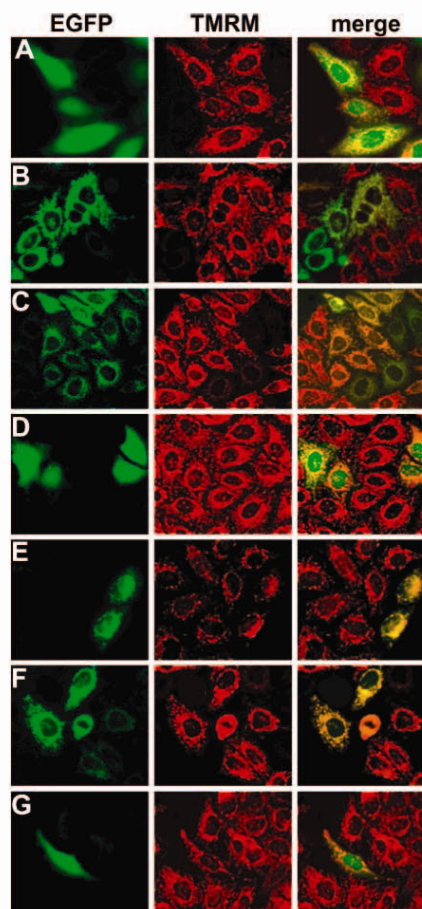
209 *Peptide-Induced Leakage of Liposome Contents.* Leakage
 210 of liposome contents was monitored by the release of
 211 encapsulated [^3H]inulin. Three nanomoles of tritiated inulin
 212 ([^3H]inulin, 0.63 Ci/mmol; Amersham) was added to the
 213 aqueous phase during liposome preparation. Liposomes were
 214 washed and pelleted as described above. Radioactive lipo-
 215 somes were then incubated with increasing concentrations
 216 of peptides in 100 mM Tris and 136 mM NaCl, pH 7.4, for
 217 1 h at 4 °C. Leakage was calculated after ultracentrifugation
 218 (25000 rpm for 1 h at 4 °C) by counting radioactivity
 219 associated with the supernatant and pellet with a liquid
 220 scintillation analyzer (Packard, Rungis, France). The leakage
 221 amount was obtained after normalization with untreated
 222 liposomes (0%) or demaseptin S3-treated liposomes (100%).
 223 Demaseptin has been shown to permeabilize liposomes (12).

224 *Mitochondrial Aggregation.* HeLa cells (10^6) were lysed
 225 in buffer A (220 mM mannitol, 68 mM sucrose, 10 mM
 226 Hepes–KOH, 70 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1
 227 mM DTT, pH 7.7) for 30 min at 4 °C, dounced, and
 228 centrifuged (400g, 5 min). Supernatant was recentrifuged
 229 (1500g, 30 min). Pelleted mitochondria were resuspended
 230 in chilled buffer A and incubated with peptides at 62.5, 125,
 231 and 250 μM (30 min, 4 °C). Aggregation of mitochondria
 232 was measured by turbidimetry at 436 nm.

233 **RESULTS**

234 *Delineation of the Mitogaligin Mitochondrial Targeting*
 235 *Signal.* Previous experiments have shown that the mito-
 236 chondrial localization sequence of mitogaligin is contained
 237 between amino acids 31 and 54 (5). In order to delineate

Membrane Destabilizing Activity of Mitogaligin C



238 **FIGURE 2:** Determination of the mitochondrial-addressing signal
 239 of mitogaligin. HeLa cells were transfected with constructs encoding
 240 truncated forms of mitogaligin fused to EGFP and analyzed 24 h
 241 later by fluorescence microscopy for EGFP production (column
 242 EGFP) or mitochondrial staining with TMRM (column TMRM).
 243 Colocalization of mitogaligin-derived peptides and mitochondria
 244 was evaluated by merging the pictures (column merge). Vectors
 245 produce EGFP (A), full-length mitogaligin-EGFP (B), mitogaligin-
 246 [31–54]-EGFP (C), mitogaligin-[32–54]-EGFP (D), mitogaligin-
 247 [31–48]-EGFP (E), mitogaligin-[31–47]-EGFP (F), and mitogaligin-
 248 [31–46]-EGFP (G).

239 more precisely this signal, cells were transfected with vectors
 240 encoding sequential deletions of this fragment fused to EGFP.
 241 Deletions were performed at the N- or C-terminal ends of
 242 the 31–54 sequence. Fluorescence microscopy observations
 243 of transfected cells show that the minimal mitochondrial
 244 targeting sequence of mitogaligin extends from arginine 31
 245 to tryptophan 47 (Figure 2). Indeed, further deletions of
 246 residue arginine 31 or tryptophan 47 lead to cytosolic
 247 localization of the fusion protein. TMRM staining indicated
 248 that transfected and nontransfected cells displayed no major
 249 differences in the morphology of their mitochondria. How-
 250 ever, TMRM labeling is often weaker and sometimes

D Gonzalez et al.



FIGURE 3: Release of mitochondrial cytochrome *c* upon transfection of plasmids encoding the mitochondrial targeting domain of mitogaligin. Cells were transfected with vectors encoding deleted forms of mitogaligin-EGFP containing a functional (lanes 1–5) or nonfunctional mitochondrial localization signal (lanes 6–8). Accumulation of cytosolic cytochrome *c* was analyzed by western blotting. Expression vectors produce intact mitogaligin (lane 1), mitogaligin-[31–54] (lane 2), mitogaligin-[31–47] (lane 3), mitogaligin-[31–48] (lane 4), mitogaligin-[31–49] (lane 5), mitogaligin-[32–54] (lane 6), mitogaligin-[31–46] (lane 7), and EGFP (lane 8). Lane M is horse cytochrome *c*, and lane S is supernatant from mitochondria treated with saponin.

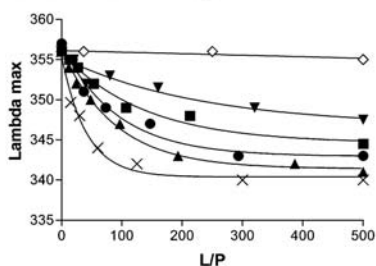


FIGURE 4: Titration of peptide MG-[31–53] by anionic liposomes. Measurements were realized by adding increasing amounts of phospholipids (L) to constant peptide concentration (200 nM) (P). The λ_{max} value of fluorescence was plotted against the L/P ratio. Liposomes were made of PC/Chol and anionic phospholipids, cardiolipin (x), PG (■), CDP-DAG (▲), PA (●), PI (▼), or PS (◇).

250 abolished in cells expressing peptides addressed to mito-
251 chondria, indicating a decrease in the mitochondrial mem-
252 brane potential.

253 *Transfection of Vectors Encoding the Mitogaligin Mitochondrial-Targeting Signal Induces Cytochrome c Release.*
254 In order to know whether mitochondrial destabilization is
255 directly linked to the mitochondrial targeting sequence,
256 accumulation of cytosolic cytochrome *c* was assayed upon
257 transfection with vectors encoding deleted forms of mito-
258 galigin-EGFP fusions (Figure 3). Prior to preparation of cell
259 extracts, cells were checked by fluorescence microscopy for
260 expression and correct localization of the hybrid proteins.
261 Cytochrome *c* release was observed only when plasmids
262 encoding a functional mitochondrial targeting sequence were
263 used. Fusions of EGFP to 32–54 mitogaligin or 31–46
264 mitogaligin did not induce significant cytochrome *c* release.
265 These results indicate that a complete signal is required to
266 induce mitochondrial damage.

267
268 *Preferential Binding of Mitogaligin-Derived Peptides to Lipid Vesicles Containing Cardiolipin.* MG-[31–53], a
269 synthetic peptide encompassing the mitochondrial targeting
270 sequence of mitogaligin (Figure 1), was assayed for binding
271 to liposomes by tryptophan fluorescence titration (11). When
272 increasing amounts of zwitterionic liposomes (PC/Chol) were
273 added to 200 nM peptide solutions, no shift of the maximum
274 fluorescence emission wavelength of tryptophan was detected
275 (data not shown). The same observation was made with
276 anionic liposomes containing PS (Figure 4). These results
277 reveal that MG-[31–53] has no or very low affinity for these
278 neutral or negatively charged liposomes. At the contrary, blue
279

Biochemistry

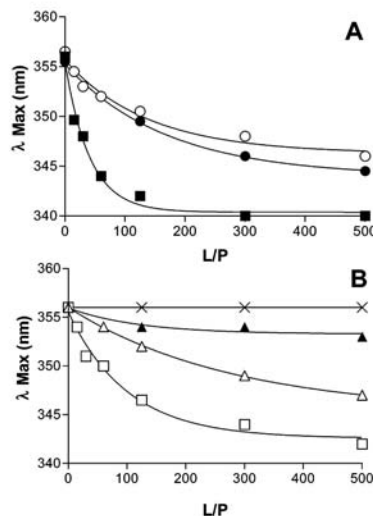


FIGURE 5: Titration of mitogaligin-derived peptides by cardiolipin-containing liposomes. PC/Chol/cardiolipin liposomes were incubated with (A) peptides MG-[31–53] (■), MG-[12–34] (●), and MG-[55–75] (○) and (B) peptide MG-[35–53] (□) and three analogues of MG-[35–53]: S39/E (△), T38S39/EE (▲), and R40R41/AA (×) (see Figure 1 for peptide sequences). The λ_{max} value of fluorescence was plotted against the lipid to peptide ratio (L/P) for P = 200 nM.

280 shifts were recorded upon titration with liposomes containing
281 different anionic phospholipids. The highest affinity was
282 observed for cardiolipin-containing liposomes (partition
283 coefficient, $K_p = 10^{-6} \text{ M}^{-1}$). PI conferred much lower affinity than
284 cardiolipin-containing liposomes ($K_p = 1.3 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1}$).
285 The phospholipids structurally related to cardiolipin
286 (PG, $K_p = 1.8 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1}$, CDP-DAG, $K_p = 3.4 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1}$,
287 and PA, $K_p = 2.9 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1}$) displayed intermediate
288 affinities. Since the experiments were realized using lipid
289 compositions that maintain the same amount of negative
290 charges, these differences in affinities are not entirely related
291 to electrostatic contribution.

292 Two other mitogaligin-derived peptides were also tested
293 for binding to cardiolipin-containing vesicles (Figure 5A).
294 These peptides, MG-[12–34] and MG-[55–75], which did
295 not include the mitochondrial targeting signal underwent a
296 significant blue shift fluorescence emission. However, binding
297 saturation of MG-[31–53] was reached for a much lower
298 lipid to peptide (L/P) ratio, revealing a higher binding affinity
299 for this peptide containing the mitochondrial targeting signal.
300 Indeed, K_p for MG-[31–53], MG-[12–34], and MG-[55–
301 75] are 10^{-6} , 0.26×10^{-6} , and $0.16 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$, respec-
302 tively.

303 *Electrostatic Contribution to Binding of Mitogaligin-Derived Peptides to Liposomes.* Peptide–membrane interactions
304 frequently result from a balance between electrostatic
305 and hydrophobic interactions. To evaluate the electrostatic
306 contribution in the binding of mitogaligin-derived peptides
307 to cardiolipin-containing liposomes, peptides, initially
308 designed to assess implications of putative phosphorylation sites
309 (S39/E and T38S39/EE), were tested for their capacity to
310 interact with synthetic membranes and compared to their
311

Biochemistry

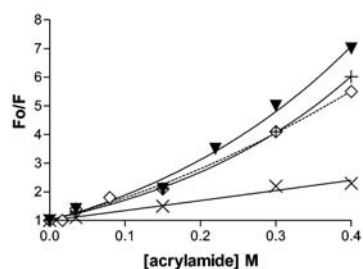


FIGURE 6: Fluorescence quenching by acrylamide. Increasing amounts of acrylamide were added to a constant concentration of MG-[31-53] in the absence (+) or in the presence of liposomes containing PC/Chol (▼), PC/PS/Chol (◇), or PC/cardioliipin/Chol (×). The ratio of lipid/peptide is 100. F_0 = fluorescence intensity without quenching. F = fluorescence intensity in the presence of acrylamide quencher.

parent peptide, MG-[35-53] ($K_p = 0.47 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$) (Figure 5B). Substitution of hydroxylated residue S39 with negatively charged residue (E) led to peptides exhibiting marked decreases in blue shift, indicating a loss of interaction with liposomes ($K_p = 0.7 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1}$) (Figure 5B). This effect was more pronounced for the disubstituted peptide T38S39/EE since binding was almost abolished. The effect of the reduction of the global charge of peptide MG-[31-53] was further investigated using the peptide R40R41/AA. Instead of adding negative charges to the peptide, the two arginines 40 and 41 were replaced with alanines, leading to a peptide with a net charge of +3. Although this peptide has the same global charge as the peptide S39/E, no blue shift or fluorescence emission was detected, indicating a more drastic inhibition.

Acrylamide Fluorescence Quenching of Mitogaligin-Derived Peptides. The acrylamide fluorescence quenching method was used to further characterize the interaction of MG-[31-53] with liposomes (Figure 6). Fluorescence of MG-[31-53] is very sensitive to quenching when the peptide is in a solution free of liposomes [$K_{SV}(\text{eff}) = 8.1 \text{ M}^{-1}$]. A two-phase process can be observed. Quenching is linear for low concentrations of acrylamide, which is characteristic of collisional quenching (14). Higher concentrations induce upward curvature obtained classically for static quenching where collision is faster than the process of photon reemission. Very similar profiles (Figure 6) and Stern-Volmer constants were obtained in the presence of zwitterionic liposomes [$K_{SV}(\text{eff}) = 8.7 \text{ M}^{-1}$] or anionic liposomes containing PS [$K_{SV}(\text{eff}) = 8.3 \text{ M}^{-1}$]. This result is not surprising considering that little interaction was detected between this peptide and these liposomes. However, when cardioliipin-containing liposomes are used, quenching is linear over the range of acrylamide concentration and the quenching constant decreases largely [$K_{SV}(\text{eff}) = 3.5 \text{ M}^{-1}$]. These results confirm the significant interaction of tryptophan residues of MG-[31-53] with the cardioliipin-containing membrane.

Liposome Aggregation by Mitogaligin-Derived Peptides. Because galig expression induces mitochondria aggregation, it was studied whether mitogaligin-derived peptides could be directly involved in this process. Aggregation of lipid vesicles was assayed by monitoring the turbidity of liposome suspension at 436 nm (Figure 7). Among the six peptides

Membrane Destabilizing Activity of Mitogaligin E

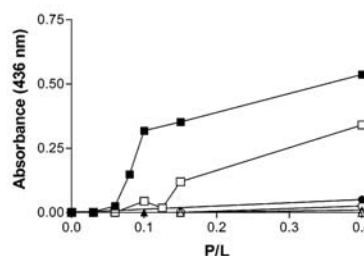


FIGURE 7: Aggregation of PC/cardioliipin/Chol liposomes was followed by measuring absorbance at 436 nm with increasing peptide/lipid ratio (P/L). The lipid concentration was maintained constant. Key: peptides MG-[31-53] (■), MG-[12-34] (●), MG-[55-75] (○), MG-[35-53] (□), S39/E (△), and T38S39/EE (▲) (see Figure 1 for peptide sequences).

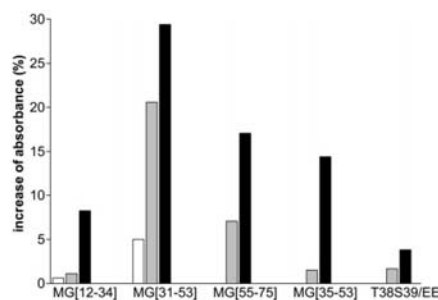


FIGURE 8: Aggregation of isolated mitochondria by peptides derived from mitogaligin. Isolated mitochondria were incubated with peptides at concentrations of 62.5 μM (white bars), 125 μM (gray bars), and 250 μM (black bars). Aggregation of mitochondria was followed by measuring absorbance at 436 nm. The Y-axis represents the increase of absorbance before and after addition of peptide to the mitochondria preparation.

added on liposomes containing cardioliipin, only two promoted liposome aggregation: MG-[31-53] and MG-[35-53], the latter being less efficient. No significant aggregation was observed with peptides MG-[12-34] or MG-[55-75] or with the two analogues of MG-[35-53] (S39/E and T38S39/EE). With anionic liposomes containing phosphatidylserine, only a slight aggregation could be observed for MG-[31-53] and only at higher peptide/lipid ratios (data not shown). Zwitterionic liposomes did not aggregate with any of the peptides (data not shown). As for binding experiments, liposome aggregation appears to be dependent on peptide sequence and lipid composition.

Aggregation of Isolated Mitochondria by Mitogaligin-Derived Peptides. Mitochondria were isolated from HeLa cells and incubated with increasing concentrations of the different peptides. Aggregation was assayed by monitoring the turbidity of mitochondria suspension at 436 nm (Figure 8) and checked by fluorescence microscopy (data not shown). Similarly to results obtained with synthetic membranes, mitochondria aggregation was the most efficient with MG-[31-53]. As expected, peptide MG-[35-53] exhibited less aggregation, and its mutant T38S39/EE showed no aggregation. A very weak aggregating activity was observed with MG-[12-34] and was barely visible under microscopy (data not shown). However, MG-[55-75] was as efficient as MG-

F Gonzalez et al.

Biochemistry

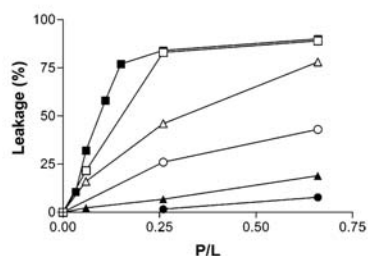


FIGURE 9: Liposome leakage assay. Permeabilization of PC/cardiophospholipin/Chol liposomes was evaluated by measuring the release of entrapped [³H]inulin for increasing ratios of peptide/lipid (P/L). L is maintained constant. Key: peptides MG-[31-53] (■), MG-[12-34] (●), MG-[55-75] (○), MG-[35-53] (□), S39/E (△), and T38S39/EE (▲).

380 [35-53] in inducing aggregation of isolated mitochondria
381 while it did not induce liposome aggregation.

382 *Membrane Destabilization Activity of Peptides Derived*
383 *from Mitogaligin.* Membrane destabilization activity was
384 evaluated by measuring the radioactivity released from [³H]-
385 inulin-containing liposomes incubated with increasing con-
386 centration of peptides (Figure 9). Zwitterionic liposomes did
387 not leak with any of the peptides (data not shown). At the
388 contrary, cardiophospholipin-containing liposomes were efficiently
389 permeabilized with peptide MG-[31-53] and to a lesser
390 extent with peptide MG-[35-53] (Figure 9). As expected
391 from above data, destabilization was much more reduced
392 for peptides MG-[12-34] and MG-[55-75]. Once again,
393 the mono- or disubstituted analogue peptides MG-
394 [35-53], S39/E and T38S39/EE, exhibited a lower perme-
395abilizing activity as compared to their parent peptide MG-
396 [35-53].

397 DISCUSSION

398 *Galig* expression was previously found to be cytotoxic
399 when expressed in HeLa or MCF7 cells (5). Although the
400 cell death pathway is not yet defined, typical markers of
401 apoptosis can be evidenced such as loss of plasma membrane
402 asymmetry, nucleic acid condensation, and cell shrinkage.
403 It is now well established that disruption of mitochondria
404 integrity constitutes frequently a key step of cell death (1-
405 4, 16). In this context, we have proposed that mitochondria
406 play also a central role during the process of *galig*-induced
407 cell death. Indeed, besides that *galig* encodes a mitochondrial
408 protein named mitogaligin, the pivotal role of mitochondria
409 in *galig* cytotoxicity is supported by the facts that *galig*
410 expression promoted the release of mitochondrial cytochrome
411 *c* and that Bcl-XL, a member of Bcl-2 family, inhibited *galig*
412 induced cell death (5). Because mitogaligin is located at the
413 mitochondria, we have undertaken the present study to
414 evaluate the possible effects of mitogaligin on destabilization
415 of the mitochondrial membrane.

416 *The Mitochondrial-Targeting Sequence of Mitogaligin*
417 *Binds to Anionic Phospholipids Related to Cardiolipin.*
418 Previous structure-activity relationship studies showed that
419 the mitochondrial addressing of mitogaligin relies on an
420 internal sequence bearing cytotoxicity (5). In this paper, the
421 mitochondrial localization signal of mitogaligin has been
422 precisely delineated by expressing truncated forms of mi-

423 togaligin fused to EGFP (Figure 2). Arginine 31 and
424 tryptophan 47 border the minimal targeting sequence. This
425 sequence has a typical amino acid composition of a mito-
426 chondrial signal characterized by enrichment in basic,
427 hydrophobic, and hydroxylated residues (17). Binding assays
428 of synthetic mitogaligin-derived peptides on liposomes
429 confirmed that the central region containing the mito-
430 chondrial-addressing signal of mitogaligin is the major mem-
431 brane-interacting sequence. However, the lipid binding activity is
432 not strictly restricted to the addressing signal. Indeed, peptide
433 MG-[35-53] lacks residues 31-34 and is not expected to
434 be addressed to mitochondria. However, this peptide still
435 binds to liposomes containing cardiolipin although less
436 efficiently than MG-[31-53] (Figures 5B, 7, and 9). It is
437 possible that mitogaligin needs a complete functional signal
438 to be addressed to mitochondria but that interaction with
439 synthetic lipid vesicles requires a minimum affinity. Indeed,
440 the partition coefficient of MG-[35-53] is lower than that
441 of MG-[31-53] but is higher than those of MG-[55-75]
442 and MG-[12-34], which bind poorly to liposomes. Above
443 all, binding to liposomes revealed that peptides interact
444 directly with phospholipid membranes without any protein
445 involvement (Figures 4 and 5). This binding relies on
446 electrostatic interaction between cationic peptides and anionic
447 phospholipids. Indeed, peptide analogues of MG-[35-53]
448 with a reduced cationic net charge (T38S39/EE and S39/E)
449 exhibited a decrease in membrane binding affinity. The
450 peptide R40R41/AA, with the same global charge as S39/E,
451 did not interact with liposomes containing cardiolipin,
452 suggesting that the amino acid composition should also be
453 taken into account. Consequently, the arginine doublet could
454 play a critical role in this interaction.

455 Concerning the lipid partner, the anionic property of the
456 phospholipid is not the unique feature driving this binding
457 since PS liposomes do not interact with mitogaligin-derived
458 peptides (Figure 4). In the same line of evidence, PI, another
459 anionic phospholipid, showed only low-affinity binding.
460 These results suggest that, besides the anionic property,
461 binding requires the particular structural feature of the
462 phospholipid. In that regard, it should be noted that phos-
463 pholipids promoting high-affinity binding are structurally and
464 metabolically related to cardiolipin, a phospholipid implicated
465 in numerous vital functions such as respiration, ATP
466 synthesis, mitochondrial protein import (18-21), and mito-
467 chondria-mediated cell death (22-24). Cardiolipin and its
468 precursors are particularly concentrated at junctions between
469 outer and inner mitochondrial membranes which might
470 constitute anchor points for mitogaligin binding (25, 26). In
471 fact, cardiolipin and several anionic phospholipids have been
472 shown to mediate binding of tBid, a proapoptotic member
473 of the Bcl-2 family, through electrostatic and hydrophobic
474 interactions (27, 28). Interestingly, the preferential binding
475 profile of mitogaligin to cardiolipin, PA, PG, and PI appeared
476 to be very similar to that of tBid (27).

477 While not addressed in this paper, the possible effect of
478 lipid curvature should also be considered. In the case of tBid,
479 it has been shown that, in the presence of cardiolipin, leakage
480 results from induction of negative membrane curvature (29).
481 Replacement of cardiolipin with PG, which does not promote
482 membrane curvature, prevents tBid from initiating leakage.
483 In this regard, it is interesting to note that Bcl-X_L, an
484 antiapoptotic protein which inhibits tBid activity by reducing

Biochemistry

485 the promotion of nonbilayer phases (29), interferes also with
486 cell death induced by *galig* expression (5).

487 In addition to electrostatic contributions, hydrophobic
488 interactions participate to peptide binding as evidenced by
489 quenching experiments showing that tryptophans interact
490 significantly with the lipid bilayer (Figure 6). This may
491 suggest a possible insertion of the peptide within the
492 membrane but has to be confirmed by NMR. Fluorescence
493 quenching is classically used to study the insertion of
494 polypeptides within a lipid bilayer. However, in the case of
495 tBid, although acrylamide fluorescence quenching suggests
496 an insertion within the membrane, NMR reveals that the
497 protein is in a parallel orientation with the membrane lipids
498 (30).

499 *The Mitochondrial-Targeting Sequence of Mitogaligin*
500 *Induces Aggregation and Leakage of Mitochondria and*
501 *Cardiolipin-Containing Vesicles*. MG-[31–53], which covers
502 the complete mitochondrial addressing signal, is the most
503 effective peptide in aggregating cardiolipin-containing lip-
504 osomes. This activity is dose-dependent on the peptide to
505 lipid ratio (Figure 7). Interestingly, peptides issued from other
506 regions of mitogaligin were not able to induce aggregation
507 of liposomes. Similarly, MG-[31–53] strongly aggregates
508 isolated mitochondria (Figure 8). This aggregation is associ-
509 ated with membrane damages as cytochrome *c* is released
510 from these isolated mitochondria (5). However, it should be
511 taken into account that the peptide MG-[55–75] and to a
512 lesser degree MG-[12–34], while having no aggregating
513 activity on liposomes, are able to promote some aggregation
514 of isolated mitochondria. Consequently, we cannot exclude
515 that, in addition to lipids, other factors facilitate aggregation
516 of the mitochondrial membrane by mitogaligin-derived
517 peptides.

518 These results reflect the clustering of mitochondria ob-
519 served during cell death induced by *galig* expression (5).
520 This aggregating activity is reminiscent of that observed with
521 proapoptotic effectors such as tBid (31, 32) or Bax (33).
522 However, our data do not allow to conclude that the release
523 of cytochrome *c* from mitochondria of *galig* transfected cells
524 (5) and from cells expressing truncated forms of mitogaligin
525 (Figure 3) is a direct consequence of mitochondria aggrega-
526 tion. Mitochondrial aggregation has been postulated to be
527 an essential step for the cytochrome *c* release in mitochon-
528 dria-dependent cell death (34, 35). However, it is now more
529 prevalent that other morphological changes such as mito-
530 chondrial fission and cristae remodeling are primary events
531 leading to cytochrome *c* release (36, 37). Further investiga-
532 tion will be necessary to evaluate the possible implication
533 of mitogaligin or mitogaligin-derived peptides in these
534 events.

535 Given the *in vitro* observation that peptides derived from
536 mitogaligin induce mitochondrial aggregation, it may be
537 surprising that no difference in mitochondria morphology
538 was noticeable *in vivo* upon cell transfection (Figure 2).
539 However, when peptides are addressed to mitochondria,
540 TMRM labeling, which is sensitive to mitochondrial mem-
541 brane potential (38), is often weaker or even abolished, thus
542 indicating a loss of mitochondrial membrane integrity. A
543 comparable situation is also observed after transfection of
544 the *galig* gene. Aggregation appears lately several hours after
545 production of the protein (ref 5 and unpublished results).
546 This difference in the rate of mitochondria aggregation *in*

Membrane Destabilizing Activity of Mitogaligin G

547 *vivo* and *in vitro* could be related to the concentration of
548 peptides/protein. The intracellular concentration of peptides
549 or protein upon gene transfection may be low when compared
550 to *in vitro* experiments. Indeed, when peptide MG-[35–53]
551 is microinjected in the cytosol, aggregation is immediate
552 while MG-[12–34] has little effect and MG-[55–75] has
553 no effect (5).

554 Experiments with liposomes show that direct interaction
555 between anionic lipids and the mitochondrial addressing
556 peptide of mitogaligin is necessary for aggregation and
557 leakage (Figures 7 and 9). However, the precise mechanism
558 of cytochrome *c* release remains to be elucidated. It should
559 be noted that, *in vivo*, the release of cytochrome *c* after
560 transfection of the truncated forms of mitogaligin is limited.
561 The major part of cytochrome *c* remains associated with
562 mitochondria pellets (data not shown). Such an observation
563 was also made with the cardiolipin binding domain of tBid
564 which, by itself, can suppress mitochondrial respiration by
565 interaction with cardiolipin. This isolated sequence can also
566 induce cytochrome *c* release but was much less potent than
567 tBid (39). It has been postulated that this may be related to
568 the absence of a BH3 domain. Similarly, it is possible that,
569 in addition to the cardiolipin binding domain of mitogaligin,
570 other sequences are required to obtain complete dissociation
571 and release of cytochrome *c*.

572 As postulated for tBid, mitogaligin, upon binding to
573 cardiolipin, could dissociate the cardiolipin–cytochrome *c*
574 complex also stabilized by electrostatic and hydrophobic
575 interactions (19, 40, 41). This would allow cytochrome *c*
576 release in the intermembranous space of mitochondria (42).
577 Leakage from mitochondria would concomitantly result from
578 a lipid phase transition to hexagonal phase II of cardiolipin
579 (29, 43). However, this functional similarity is not related
580 to a structural homology. The structure of the tBid-cardiolipin
581 binding domain has been elucidated and consists of three α
582 helices (27, 47). Analysis of the mitogaligin sequence by
583 different prediction programs reveals no secondary structures.
584 Nevertheless, it is possible that the lipid environment affects
585 folding and that mitogaligin and mitogaligin-derived peptides
586 acquired their final structure upon binding to the membrane.
587 This study is under current investigation.

588 Mitogaligin has a structure rich in cationic residues (12%
589 arginine) and in tryptophans (12%). Although no sequence
590 homology was found with any other known proteins,
591 including proteins from the Bcl-2 family, such amino acid
592 composition is reminiscent of Trp-rich cationic antimicrobial
593 peptides such as indolicidin, tritripticin, and lactoferricin
594 derivatives (45–47). Such cytotoxic peptides are known to
595 destabilize anionic membranes (48, 49).

596 Altogether, the results presented in this paper show that
597 mitogaligin is a new cell death effector which interacts with
598 mitochondrial phospholipids related to cardiolipin and in-
599 duces mitochondrial membrane destabilization and leakage
600 of cytochrome *c*. The exact mechanism of cytochrome *c*
601 release remains to be elucidated though it could present
602 similarity with that of some antimicrobial peptides.

ACKNOWLEDGMENT

603
604 We are grateful to Dr. Agnès Delmas (CNRS, Centre de
605 Biophysique Moléculaire, Orléans, France) for guidance on
606 peptide synthesis.

607

REFERENCES

- 608 1. Green, D. R., and Evan, G. I. (2002) A matter of life and death, *Cancer Cell* 1, 19–30.
- 609 2. Newmeyer, D. D., and Ferguson-Miller, S. (2003) Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death, *Cell* 112, 481–490.
- 610 3. Bouchier-Hayes, L., Lartigue, L., and Newmeyer, D. D. (2005) Mitochondria: pharmacological manipulation of cell death, *J. Clin. Invest.* 115, 2640–2647.
- 611 4. Martinou, J. C., and Green, D. R. (2001) Breaking the mitochondrial barrier, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2, 63–67.
- 612 5. Duneau, M., Boyer-Guittaut, M., Gonzalez, P., Charpentier, S., Normand, T., Dubois, M., Raimond, J., and Legrand, A. (2005) Galig, a novel cell death gene that encodes a mitochondrial protein promoting cytochrome *c* release, *Exp. Cell Res.* 302, 194–205.
- 613 6. Guittaut, M., Charpentier, S., Normand, T., Dubois, M., Raimond, J., and 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.
- 614 7. Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B., and Behr, J. P. (1995) A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 7297–7301.
- 615 8. King, D. S., Fields, C. G., and Fields, G. B. (1990) A cleavage method which minimizes side reactions following Fmoc solid phase peptide synthesis, *Int. J. Pept. Protein Res.* 36, 255–266.
- 616 9. Delmotte, C., Le, Guern, E., Trudelle, Y., and Delmas, A. (1999) Structural features of a chimeric peptide inducing cytotoxic T lymphocyte responses in saline, *Eur. J. Biochem.* 265, 336–345.
- 617 10. Zhou, X., and Arthur, G. (1992) Improved procedures for the determination of lipid phosphorus by malachite green, *J. Lipid Res.* 33, 1233–1236.
- 618 11. Ladokhin, A. S., Jayasinghe, S., and White, S. H. (2000) How to measure and analyze tryptophan fluorescence in membranes properly, and why bother?, *Anal. Biochem.* 285, 235–245.
- 619 12. Pouny, Y., Rapaport, D., Mor, A., Nicolas, P., and Shai, Y. (1992) Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes, *Biochemistry* 31, 12416–12423.
- 620 13. Beschiaschvili, G., and Seelig, J. (1990) Melittin binding to mixed phosphatidylglycerol/phosphatidylcholine membranes, *Biochemistry* 29, 52–58.
- 621 14. Efkink, M. R., and Ghiron, C. A. (1976) Exposure of tryptophanyl residues in proteins. Quantitative determination by fluorescence quenching studies, *Biochemistry* 15, 672–680.
- 622 15. Persson, D., Thoren, P. E., and Norden, B. (2001) Penetratin-induced aggregation and subsequent dissociation of negatively charged phospholipid vesicles, *FEBS Lett.* 505, 307–312.
- 623 16. Kuwana, T., and Newmeyer, D. D. (2003) Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis, *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 691–699.
- 624 17. Truscott, K. N., Brandner, K., and Pfanner, N. (2003) Mechanisms of protein import into mitochondria, *Curr. Biol.* 13, R326–R337.
- 625 18. Weiss, C., Opliger, W., Vergeres, G., Demel, R., Jenö, P., Horst, M., de Kruijff, B., Schatz, G., and Azem, A. (1999) Domain structure and lipid interaction of recombinant yeast Tim44, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 8890–8894.
- 626 19. Demel, R. A., Jordi, W., Lambrechts, H., van Damme, H., Hovius, R., and de Kruijff, B. (1989) Differential interactions of apo- and holo-cytochrome *c* with acidic membrane lipids in model systems and the implications for their import into mitochondria, *J. Biol. Chem.* 264, 3988–3997.
- 627 20. Ou, W. J., Ito, A., Umeda, M., Inoue, K., and Omura, T. (1988) Specific binding of mitochondrial protein precursors to liposomes containing cardiolipin, *J. Biochem. (Tokyo)* 103, 589–595.
- 628 21. Jiang, F., Ryan, M. T., Schlame, M., Zhao, M., Gu, Z., Klingenberg, M., Pfanner, N., and Greenberg, M. L. (2000) Absence of cardiolipin in the *crd1* null mutant results in decreased mitochondrial membrane potential and reduced mitochondrial function, *J. Biol. Chem.* 275, 22387–22394.
- 629 22. Garcia Fernandez, M., Troiano, L., Moretti, L., Nasi, M., Pinti, M., Salvioli, S., Dobrucki, J., and Cossarizza, A. (2002) Early changes in intramitochondrial cardiolipin distribution during apoptosis, *Cell Growth Differ.* 13, 449–455.
- 630 23. Petrosillo, G., Ruggiero, F. M., and Paradies, G. (2003) Role of reactive oxygen species and cardiolipin in the release of cytochrome *c* from mitochondria, *FASEB J.* 17, 2202–2208.
- 631 24. Kagan, V. E., Tyurin, V. A., Jiang, J., Tyurina, Y. Y., Ritov, V. B., Amoscato, A. A., Osipov, A. N., Belikova, N. A., Kapralov, A. A., Kini, V., Vlasova, I., Zhao, Q., Zou, M., Di, P., Svistunenko, D. A., Kurnikov, I. V., and Bonisenko, G. G. (2005) Cytochrome *c* acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors, *Nat. Chem. Biol.* 1, 223–232.
- 632 25. Ardail, D., Privat, J. P., Egret-Charlier, M., Levrat, C., Lerme, F., and Louisot, P. (1990) Mitochondrial contact sites. Lipid composition and dynamics, *J. Biol. Chem.* 265, 18797–18802.
- 633 26. Boya, P., Roques, B., and Kroemer, G. (2001) New EMBO members' review: viral and bacterial proteins regulating apoptosis at the mitochondrial level, *EMBO J.* 20, 4325–4331.
- 634 27. Lutter, M., Fang, M., Luo, X., Nishijima, M., Xie, X., and Wang, X. (2000) Cardiolipin provides specificity for targeting of tBid to mitochondria, *Nat. Cell Biol.* 2, 754–761.
- 635 28. Zha, J., Weiler, S., Oh, K. J., Wei, M. C., and Korsmeyer, S. J. (2000) Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis, *Science* 290, 1761–1765.
- 636 29. Epand, R. F., Martinou, J. C., Fornallaz-Mulhauser, M., Hughes, D. W., and Epand, R. M. (2002) The apoptotic protein tBid promotes leakage by altering membrane curvature, *J. Biol. Chem.* 277, 32632–32639.
- 637 30. Gong, X. M., Choi, J., Franzin, C. M., Zhai, D., Reed, J. C., and Marassi, F. M. (2004) Conformation of membrane-associated proapoptotic tBid, *J. Biol. Chem.* 279, 28954–28960.
- 638 31. Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., and Yuan, J. (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis, *Cell* 94, 491–501.
- 639 32. Zhai, D., Miao, Q., Xin, X., and Yang, F. (2001) Leakage and aggregation of phospholipid vesicles induced by the BH3-only Bcl-2 family member, BID, *Eur. J. Biochem.* 268, 48–55.
- 640 33. Desagher, S., and Martinou, J. C. (2000) Mitochondria as the central control point of apoptosis, *Trends Cell Biol.* 10, 369–377.
- 641 34. Takada, S., Shirakata, Y., Kaneniwa, N., and Koike, K. (1999) Association of hepatitis B virus X protein with mitochondria causes mitochondrial aggregation at the nuclear periphery, leading to cell death, *Oncogene* 18, 6965–6973.
- 642 35. Haga, N., Fujita, N., and Tsuruo, T. (2003) Mitochondrial aggregation precedes cytochrome *c* release from mitochondria during apoptosis, *Oncogene* 22, 5579–5585.
- 643 36. Youle, R. J., and Karbowski, M. (2005) Mitochondrial fission in apoptosis, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 6, 657–663.
- 644 37. Cereghetti, G. M., and Scorrano, L. (2006) The many shapes of mitochondrial death, *Oncogene* 25, 4717–4724.
- 645 38. Scaduto, R. C., Jr., and Grotyohann, L. W. (1999) Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives, *Biophys. J.* 76, 469–477.
- 646 39. Liu, J., Weiss, A., Durrant, D., Chi, N. W., and Lee, R. M. (2004) The cardiolipin-binding domain of Bid affects mitochondrial respiration and enhances cytochrome *c* release, *Apoptosis* 9, 533–541.
- 647 40. Nicholls, P. (1974) Cytochrome *c* binding to enzymes and membranes, *Biochim. Biophys. Acta* 346, 261–310.
- 648 41. Cortese, J. D., Voglino, A. L., and Hackenbrock, C. R. (1998) Multiple conformations of physiological membrane-bound cytochrome *c*, *Biochemistry* 37, 6402–6409.
- 649 42. Ott, M., Robertson, J. D., Gogvadze, V., Zhivotovskiy, B., and Orrenius, S. (2002) Cytochrome *c* release from mitochondria proceeds by a two-step process, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 1259–1263.
- 650 43. Seddon, J. M., Kaye, R. D., and Marsh, D. (1983) Induction of the lamellar-inverted hexagonal phase transition in cardiolipin by protons and monovalent cations, *Biochim. Biophys. Acta* 734, 347–352.
- 651 44. Chou, J. J., Li, H., Salvesen, G. S., Yuan, J., and Wagner, G. (1999) Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signalling, *Cell* 96, 615–624.
- 652 45. Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Kawase, K., and Tomita, M. (1992) Identification of the bactericidal domain of lactoferrin, *Biochim. Biophys. Acta* 1121, 130–136.

Biochemistry

PAGE EST: 8.1

Membrane Destabilizing Activity of Mitogaligin I

759	46. Selsted, M. E., Novotny, M. J., Morris, W. L., Tang, Y. Q., Smith,	768
760	W., and Cullor, J. S. (1992) Indolicidin, a novel bactericidal	769
761	tridecapeptide amide from neutrophils, <i>J. Biol. Chem.</i> 267, 4292–	770
762	4295.	
763	47. Lawyer, C., Pai, S., Watabe, M., Borgia, P., Mashimo, T., Eagleton,	771
764	L., and Watabe, K. (1996) Antimicrobial activity of a 13 amino	772
765	acid tryptophan-rich peptide derived from a putative porcine	773
766	precursor protein of a novel family of antibacterial peptides, <i>FEBS</i>	
767	<i>Lett.</i> 390, 95–98.	
		774
	48. Nissen-Meyer, J., and Nes, I. F. (1997) Ribosomally synthesized	
	antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and	
	mechanism of action, <i>Arch. Microbiol.</i> 167, 67–77.	
	49. Papo, N., and Shai, Y. (2003) Can we predict biological activity	
	of antimicrobial peptides from their interactions with model	
	phospholipid membranes?, <i>Peptides</i> 24, 1693–1703.	
	BI700213P	

Deuxième partie : ***Caractérisation de l'activité cytotoxique de la mitogaligine***

I. Introduction

Les études précédentes de l'activité de *galig* démontrent que son expression induit la mort cellulaire. Ce phénomène se traduit dans les cellules produisant la mitogaligine et la cytogaligine, par leur condensation, et à terme leur séparation du support de culture. Bien que les contributions respectives de ces protéines au processus cytotoxique ne soient pas établies, la mitogaligine y joue certainement un rôle majeur par sa capacité à induire la fuite du cytochrome c dans les cellules. Les résultats obtenus dans la première partie de cette étude viennent soutenir cette hypothèse, en démontrant que la mitogaligine pourrait être capable de perméabiliser directement la membrane externe des mitochondries par l'intermédiaire de la cardiolipine. Certains résultats nous ont toutefois amené à envisager un mode d'action plus complexe pour la mitogaligine. Il apparaît en effet que la mitogaligine n'est pas uniquement adressée à la mitochondrie. Les premiers travaux de caractérisation de ce nouvel adressage de la mitogaligine, ainsi que la caractérisation biochimique de la mort cellulaire induite par la mitogaligine sont décrits dans la seconde partie de cette étude. De nouveaux éléments de réponse suggèrent que la régulation de l'adressage de la mitogaligine puisse être impliquée dans la modulation de l'activité cytotoxique de la mitogaligine.

II. Matériel et méthodes

II.1. Construction de plasmides codants pour des protéines de fusion

La figure 37 résume les procédures permettant la construction des différents plasmides.

Le plasmide pMG-GFP code la protéine de fusion constituée de la mitogaligine et de la GFP à son extrémité C-terminale. Ce plasmide a été obtenu dans une étude précédente (Guittaut JBC 2002 276 2652).

Afin de construire le plasmide pMG-DsRed, le fragment codant pour la DsRed a été obtenu en digérant le plasmide pTOPO-RED2 (Invitrogen) par BamHI et Not I. Ce fragment a ensuite été inséré dans les mêmes sites du le plasmide pMG-GFP. pMG-DsRed code pour la mitogaligine en fusion avec la DsRed à son extrémité C-terminale.

Le plasmide pGFP-MG code pour la mitogaligine en fusion avec la GFP à son extrémité N-terminale. Afin d'obtenir ce plasmide, l'ADNc de la mitogaligine a été amplifié par PCR et a été inséré en aval de l'EGFP dans le plasmide pEGFP-C1 (CLONTECH Laboratories Inc.). Les cadres de lecture ont été placés en phase.

Le couple d'amorces CTER-LS1 (5' TGA^{CT}CAAGCTTCGATGGCCTGGCGCATG 3') / CTER-LS2 (5' TGCTCAGGATCCTAAGGCACAATCAGT 3') utilisé pour cette PCR, permet d'insérer les sites Hind III et BamHI en 5' et 3' du cDNA de la mitogaligine respectivement.

Le plasmide pGFP-MG-DsRed code pour la mitogaligine en fusion avec la GFP et la DsRed à ses extrémités N- et C-terminales respectivement. L'ADNc de la GFP a été récupéré en digérant le plasmide GFP-MG par Nhe I et Sma I, puis a été inséré en 5' de la séquence codant la mitogaligine dans le plasmide pMG-DsRed.

Le plasmide pDsRed-MG-GFP est issu de l'insertion de la séquence codante de la DsRED à l'extrémité 5' de l'ADNc de la mitogaligine dans le plasmide pMG-GFP.

La séquence de la DsRed a été amplifiée dans ce cas par PCR à l'aide des amorces RED5NHE (5' GTGGCTAGCGCCACCATGGCCTCCTCC3') et RED3BGL-DSTOP (5' GCAGAGATCTCAGGAACAGGTGGTGGCG 3'), permettant l'insertion des sites de restriction Nhe I et Bgl II aux extrémités 5' et 3' du cDNA de la DsRed respectivement.

Enfin, le plasmide pDsRed-MG a été généré en substituant la séquence codante de la GFP par le cDNA de la DsRed dans le plasmide pGFP-MG. La séquence codante de la DsRed a été récupérée en digérant le plasmide pDsRed-MG-GFP par Nhe I et Bgl II puis a été inséré dans les mêmes sites dans le plasmide pGFP-MG.

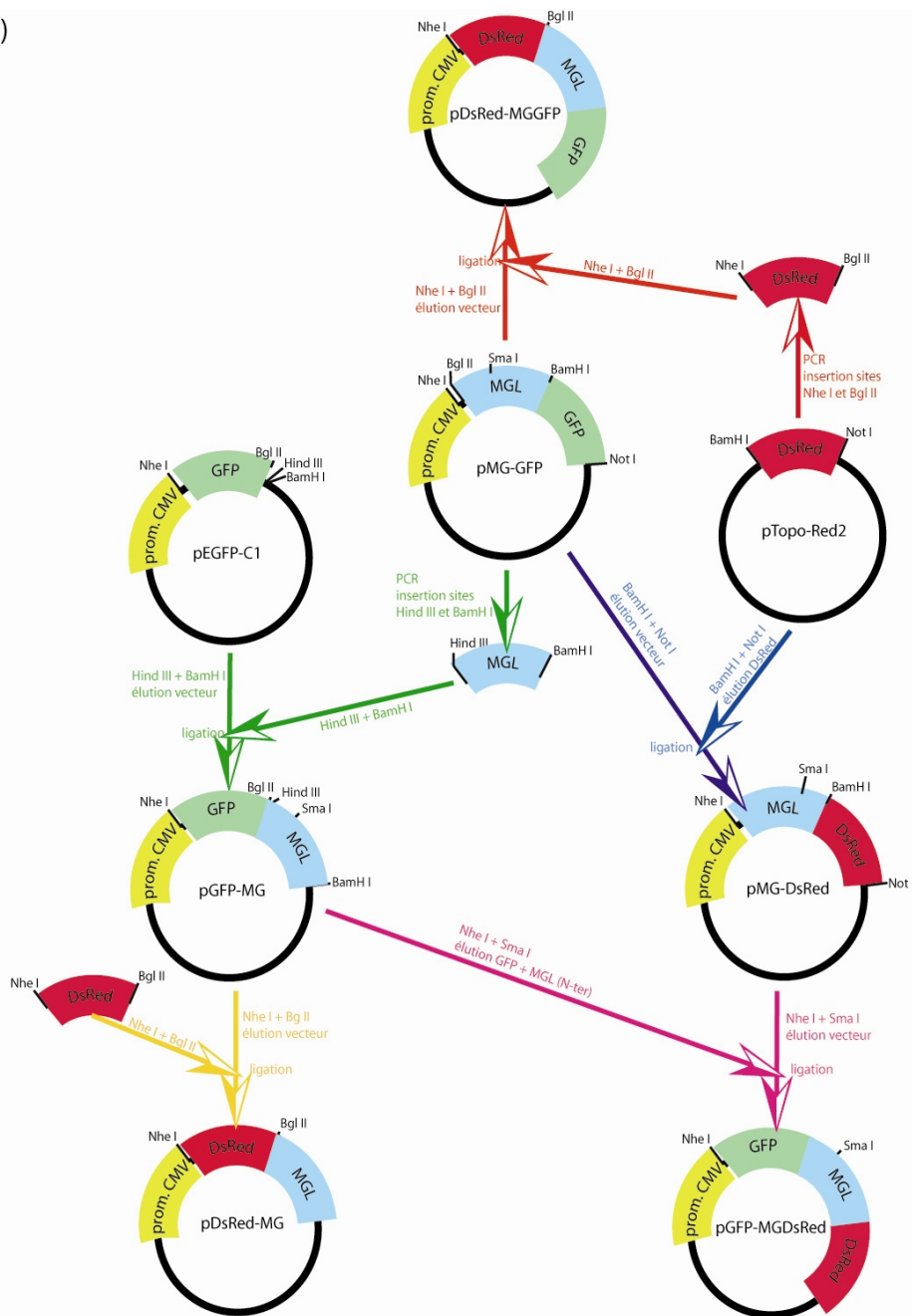
a) Condition des PCR

Le milieu réactionnel des PCR est composé de 50ng de l'ADN matrice à amplifier, 1µM de chaque amorce (MWG Biotech AG, Ebersberg, Allemagne), 0,2 mM de dNTP, une unité de *pfu* ADN polymérase (Promega), 5 µl de tampon 10X (Tris-Hcl HCl 100 mM, KCl 500mM, Nonidet P40 0,8%, pH 8,8).

La réaction de PCR est effectuée dans un appareil à cycles thermiques (iCycler Thermal Cycler, Bio-rad, USA). Après une étape de dénaturation de l'ADN de 4 minutes à 92 °C, 30 cycles du programme suivant sont réalisés :

- 1 minute à 92°C
- Etape d'hybridation 1 minute à 56°C
- Etape d'extension 1 minute 30 / kb à 72°C

A)



B)

Plasmides	Protéine fusionnée à l'extrémité N-terminale de la mitogaligine	Protéine fusionnée à l'extrémité C-terminale de la mitogaligine
pMG-GFP		GFP
pMG-DsRed		DsRed
pGFP-MG	GFP	
pDsRed-MG	DsRed	
pGFP-MG-DsRed	GFP	DsRed
pDsRed-MG-GFP	DsRed	GFP

Figure 37. A) Schéma de construction des plasmides codant pour les protéines de fusion issues de la mitogaligine. B) La position de la GFP et/ou de la DsRed dans les protéines de fusion.

Les produits de PCR amplifiés sont ensuite déposés sur gel d'agarose puis les bandes d'intérêt sont découpées et extraites du gel à l'aide du kit d'élution « QIAquick Gel Extraction Kit » (QIAGEN).

b) Digestion des sites de restriction et ligation des inserts dans les plasmides

Les plasmides et les fragments d'ADN sont digérés dans les conditions (tampon, température, temps d'incubation) indiquées par le fabricant (Promega). A la fin du temps d'incubation, les enzymes de restrictions sont dénaturées par la température ou l'ADN est séparé des enzymes sur gel d'agarose.

Les ligations sont ensuite effectuées à 22°C pendant 1 heure (temps minimum) par 2 unités de la T4 ADN ligase (fermentas Inc. Hanovre, MD) en présence d'un excès d'insert par rapport au plasmide (de 2 à 10 fois), et de 2 µl de tampon de ligation 10X (Tris-HCl HCl 400 mM, DTT 100mM, MgCl₂ 100 mM, ATP 5 mM, pH 7,8).

c) Transformation des bactéries

Des bactéries *E.coli DH5α* compétentes ont été transformées après avoir été exposées à un choc thermique. Brièvement, 50 µl de bactéries ont été incubés avec 5 µl de ligation pendant 30 minutes à 4°C, puis ont été placées dans un bain à 37°C pendant 30 secondes. Les bactéries ont ensuite été placées 2 minutes sur la glace. Après addition 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 10mM, MgSO₄ 10 mM, glucose 20 mM), les bactéries sont incubées sous agitation à 37°C pendant 1 heure. Enfin, 150 µl de la suspension bactérienne sont étalées sur une boîte contenant du milieu LB solide (Luria-Bertani ; Biomérieux, France ; peptone tryptique de caséine 1%, extraits de levure 0,5%, NaCl 10 mM, Agar 15 g/L, pH7) contenant les antibiotiques de sélection appropriés, et incubés à 37°C jusqu'à apparition des colonies.

d) Amplification des plasmides

Après avoir testé les colonies par la technique des « minipreps » classiques (Birnboim et Doly, 1979), les plasmides ont été séquencés (MWG Biotech AG) puis ont été amplifiés et purifiés à l'aide du kit Qiagen Endofree Plasmid Maxi Kit (QIAGEN).

II.2. Culture cellulaire

Les cellules HeLa ont été cultivées à 37°C en atmosphère humide contenant 5% de CO₂ dans un milieu MEM 1X (Gibco BRL Technologies Inc., Rockville, MD, Minimum Essential Medium, NaHCO₃ 0.2%, L-alanyl-glutamine 2mM, Penicilline 100U/ml, Streptomycine 100 µg/ml, pyruvate de sodium 1 mM, acides aminés non-essentiels 1 mM et SVF 10 %). Les cellules ont été mises en plaque dans des plaques 12 puits à 70000 cellules par puits 24 heures avant la transfection.

II.3. Transfections

2 µg de plasmide à transférer ont été incubés dans du sérum physiologique (NaCl 9 ‰) pendant 15 minutes à température ambiante avec 1µM de polyéthylène imine (PEI) (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), un polymère cationique permettant d'assurer l'entrée du plasmide dans les cellules (Boussif et al., 1995). Le milieu des cellules a été changé avant l'addition du complexe PEI - ADN pour du milieu DMEM, 1% pénicilline, streptomycine, sans sérum, puis les complexes n'ont été ajoutés goutte à goutte dans le milieu de culture des cellules (50 µl de complexe pour 500 µl de milieu de culture). Après une brève centrifugation des plaques (2 minutes à 1500 rpm), les cellules ont été remises à 37°C pour 2 heures. Le milieu de culture est ensuite changé pour du milieu MEM complet.

II.4. Détection de la mitogaline par western blotting

Les cellules HeLa ont été transfectées par des plasmides codant les fusions MG-GFP et GFP-MG. Lorsqu'indiqué, 10 µM de MG132, un inhibiteur du protéasome (Lee et Goldberg, 1998), ont été ajoutés 6 heures après transfection. Les cellules ont été lysées 24h post-transfection dans un tampon composé de Tris-Hcl 70 mM, SDS 2%, glycérol 10%, 2% β-mercaptoethanol, 0,01% bleu de bromophenol, pH 6,8, complété avec du PMSF et du cocktail d'inhibiteur de protéases. Les protéines ont été séparées sur gel dénaturant de polyacrylamide (12%) puis ont été transférées sur membrane de nitrocellulose (0.8 mA/cm²) pendant 30 minutes. Un anticorps polyclonal produit chez le lapin dilué au 500^{ème} dans une solution de saturation (Tris-Hcl 50 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1% (Sigma), Blocking 2% (ECL *Advance*TM blocking agent)) a été utilisé pour détecter la mitogaline, et la GFP a été détectée à l'aide d'un anticorps monoclonal commercial dilué au 50000^{ème} (Abcam Rabbit polyclonal to GFP (ab290)). Dans les deux cas, un anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplé à la HRP (Anti-rabbit IgG (Whole molecule) peroxidase conjugate, Sigma), dilué au

500000^{ème} dans la solution de saturation a été utilisé pour la révélation. Les signaux ont été obtenus par chimioluminescence (ECL *Advance*TM Kit, GE Healthcare).

II.5. Détection de la mitogaligine par immunofluorescence

Des cellules HeLa ont été cultivées sur des lamelles de verre puis ont été transfectées par des plasmides codant la forme native de la protéine ou les fusions MG-GFP et GFP-MG. 24h post-transfection, les cellules ont été fixées pendant 7 minutes à 37°C dans une solution de paraformaldéhyde à 4%, puis ont été perméabilisées dans une solution de PBS contenant 0.1% de triton X-100 pendant 7 minutes à température ambiante. Les lamelles ont été incubées avec l'anticorps anti-mitogaligine au 100^{ème} dans du PBS pendant 30 minutes à 37°C dans une chambre humide, puis avec un anticorps anti-IgG de lapin couplé à la fluorescéine isothiocyanate (FITC) (Anti-rabbit IgG (Whole molecule) FITC conjugate, Sigma) (dilution au 1000^{ème}) ou à la cyanine-3 (dilution au 1000^{ème}) pendant 45 minutes à température ambiante. Dans le cas de double marquages mitogaligine et HSP60, les lamelles ont été incubées, après deux lavages au PBS, avec l'anticorps anti-HSP60 (Anti HSP60 mouse IgG, BD Biosciences) (dilution au 100^{ème}) pendant 30 minutes à 37°C. Les cellules ont été lavées au PBS, puis ont été incubées avec un anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à la cyanine-5 (CyTM5 goat Anti-Mouse IgG (H+L) Conjugate, Zymed Laboratories) dilué au 100^{ème} dans du PBS pendant 45 minutes à température ambiante dans l'obscurité sous agitation. Les lamelles ont ensuite été montées sur lame de verre à l'aide d'une huile de montage et ont été scellées.

II.6. Déplétion cellulaire en ATP

Des cellules HeLa transfectées ont été incubées 24 h post-transfection en absence ou en présence 0.05 % d'azide de sodium (NaN₃) (Sigma) afin d'induire la déplétion d'ATP en bloquant la chaîne respiratoire mitochondriale. Les cellules ont été photographiées toutes les 5 minutes pendant 45 minutes.

II.7. Gel retard

Des quantités croissantes de peptide ont été incubées avec 600 ng du plasmide pCRTM II (Invitrogen) pendant 40 minutes à température ambiante. Le mélange a ensuite été déposé sur un gel d'agarose à 0,6 %. La migration du plasmide a été visualisée par fluorescence à

l'aide d'un BIOPRINT (Vilbert Lourmat) après intercalation de bromure d'éthidium (0,4 µg/ml) dans l'ADN.

II.8. Tests de cytotoxicité

a) Quantification de la mortalité cellulaire

Des cellules HeLa ont été transfectées par les plasmides codant différentes protéines de fusion. L'activité cytotoxique des protéines de fusion a été quantifiée par microscopie visible et par microscopie de fluorescence sur la base de critères morphologiques, les cellules mortes présentant une forte condensation, accompagnée d'une vésicularisation du cytoplasme.

b) Inhibition des caspases

L'inhibiteur général des caspases zVAD-fmk (Promega), ainsi que l'inhibiteur de la caspase 2, le zVDVAD-fmk (Biovision), ont été utilisés afin de bloquer respectivement, toutes les caspases ou uniquement la caspase 2. Ces inhibiteurs ont été ajoutés immédiatement après la transfection des cellules à une concentration finale de 10 µM. Six heures plus tard, la concentration d'inhibiteur a été augmentée pour atteindre de façon théorique la concentration finale de 20µM. Les cellules ont été incubées en présence de ces inhibiteurs jusqu'à 48 heures post-transfection.

c) Détermination de l'état de dégradation de l'ADN

L'ADN a été marqué de deux façons différentes :

- L'ADN de cellules non fixées a été marqué au Hoeschst 3342 (Sigma Aldrich) (12µg/ml) pendant 10 minutes à 37°C et observé par microscopie de fluorescence en utilisant un filtre UV (Excitation : 350 nm, Émission : 460 nm).
- Le marquage TUNEL, qui permet de détecter les extrémités 3' de l'ADN, a été réalisé à l'aide du kit *In situ* Cell Death Detection kit (Roche Diagnostics). Les cellules transfectées ont été fixées dans un bain de paraformaldéhyde à 4% dans du PBS pendant 5 minutes à 37°C et perméabilisées dans une solution de PBS contenant 0,1% de Triton X-100 pendant 5 minutes à température ambiante. Les cellules ont ensuite été incubées avec un mélange contenant la terminal désoxytransférase, des dUTP fluorescents marqués à la tetramethylrhodamine et un tampon de réaction pendant 1 heure à 37°C en chambre humide. Après montage sur lame, les lamelles, les cellules

ont été observées par microscopie de fluorescence (Excitation : 568 nm, Émission : 600 nm).

d) Evaluation de l'activité de la caspase 3

L'activation de la caspase 3 peut être directement visualisée par microscopie de fluorescence en utilisant un substrat fluorogénique spécifique, le Phiphilux (OncoImmunin, Inc. Gaithersburg, MD). Ce substrat émet en effet de fluorescence lorsqu'il est clivé par la caspase 3 (Excitation= 552 nm; Émission= 580 nm) (Packard PNAS 1996 93 11640). 48 heures post-transfection, le milieu de culture des cellules a été retiré, et après un lavage au PBS, 150 µl de substrat ont été ajoutés pendant 30 minutes à 37 °C. Les cellules ont ensuite été lavées, et ont été remises dans 300 µl de PBS puis ont été observées par microscopie de fluorescence.

e) Relargage de cytochrome c

La fuite extra-mitochondriale du cytochrome c a été détectée par immunofluorescence. Les cellules HeLa transfectées avec différents plasmides ont été cultivées sur des lamelles de verre, puis ont été fixées dans une solution de paraformaldéhyde à 4% pendant 7 minutes à 37°C. Les cellules ont ensuite été perméabilisées après une incubation de 7 minutes à 37°C dans une solution contenant 0,1% de Triton X-100. Le cytochrome a été marqué à l'aide d'un anticorps primaire anti-cytochrome c (Anti-cytochrome c monoclonal antibody, clone 6H2B4, BD Bioscience), puis d'un anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à la cyanine5 (CyTM5 goat Anti-Mouse IgG (H+L) conjugate, Zymed Laboratories). Après montage, les lamelles ont été observées par microscopie de fluorescence (Excitation cyanine5: 650 nm, Émission cyanine5: 670 nm)

f) Détection du potentiel transmembranaire mitochondrial

Les mitochondries des cellules transfectées ont été marquées avec de la Tetra-methyl Rhodamine Methyl-ester (TMRM) (0,1µg/ml pendant 10 minutes à 37 degrés), une sonde fluorescente sensible à la différence de potentiel transmembranaire mitochondrial. Les cellules marquées ont été observées par microscopie de fluorescence (Excitation : 568nm, Émission : 600nm) ou ont été quantifiées par cytométrie en flux à l'aide d'un *FACSort* (Becton Dickinson, Sunnyvale, USA). Les filtres employés permettent de détecter la GFP (FL1 : 488/525 nm), ou le TMRM (FL3 :564/600 nm) Dans ce cas, les cellules adhérentes ont

été détachées du support par trypsinisation pendant 5 minutes à 37 degrés). Après lavage, les cellules ont été conservées dans du PBS à 4°C.

g) Détection de Bax

Des cellules HeLa transfectées, cultivées sur lamelles de verre, ont été fixées dans une solution de PBS contenant 4% de paraformaldéhyde puis ont été perméabilisées dans une solution de PBS contenant 0.1% de Triton X-100. Les cellules ont ensuite été incubées sur une nuit à 4°C avec l'anticorps anti-Bax 6A7 (Mouse monoclonal anti-Bax clone 6A7, Biosource), spécifique de la forme mitochondriale de Bax (Hsu et Youle, 1997). Les lamelles ont ensuite été placées au contact d'un anticorps anti-IgG de souris couplé à la cyanine-5 (CyTM5 goat Anti-Mouse IgG (H+L) Conjugate, Zymed Laboratories) pendant 45 minutes à température ambiante. Les lamelles sont montées sur une lame de verre après addition d'une huile de montage (Vectashield, Vector Laboratories Inc.).

III. Résultats

III.1 Quantification de la cytotoxicité de la mitogaligine

Puisque *galig* code pour deux protéines, la cytogaligine et la mitogaligine, son activité cytotoxique ne peut être directement attribuée à l'une de ces protéines lorsque le gène sauvage est transfecté dans des cellules. C'est pourquoi, afin d'évaluer l'activité cytotoxique propre à la mitogaligine, la mortalité de cellules exprimant uniquement cette protéine a été quantifiée. A cette fin, un plasmide (pMG-GFP) codant pour une protéine de fusion constituée de la mitogaligine et de la GFP à son extrémité C-terminale a été utilisé. La protéine de fusion MG-GFP est adressée aux mitochondries (figure 38.A), et induit la mort de 25 % des cellules transfectées, 48 heures après transfection (figure 38.B). Ce résultat n'est pas significativement différent de celui obtenu pour les cellules transfectées par pGFP, exprimant de façon transitoire la GFP seule, puisque le taux de mortalité est dans ce cas voisin de 30 %. Ce résultat suggère par conséquent, que la mitogaligine en fusion avec la GFP à son extrémité C-terminale n'est pas cytotoxique dans ces conditions expérimentales (figure 38.B).

Afin de rejeter la possibilité d'une inhibition de l'activité cytotoxique de la mitogaligine par la GFP placée à son extrémité C-terminale, un plasmide codant une protéine de fusion constituée de la GFP placée à l'extrémité N-terminale de la mitogaligine (pGFP-MG) a été construit. La localisation de cette protéine de fusion, et sa toxicité ont été déterminées après transfection de cellules HeLa par ce plasmide. De façon surprenante, la protéine GFP-MG est principalement

localisée dans le noyau des cellules transfectées où elle est exclue des nucléoles (figure 38.A). De faibles quantités de la protéine sont toutefois localisées dans les mitochondries. D'autre part, cette protéine de fusion induit la mort d'approximativement 90% des cellules transfectées 48H après transfection (figure 38.B).

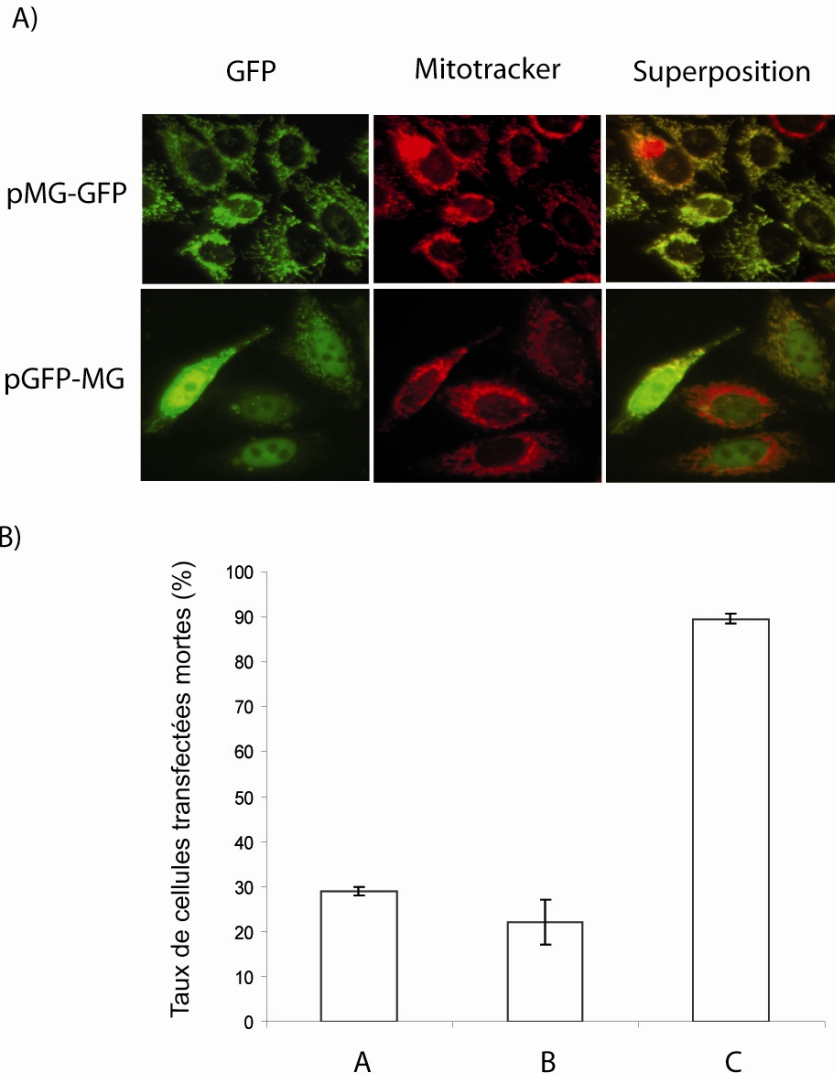


Figure 38. Localisation et cytotoxicité des protéines de fusion MG-GFP et GFP-MG. A) L'adressage des protéines de fusion a été déterminé dans des cellules Hela transfectées par pMG-GFP ou pGFP-MG par microscopie de fluorescence. Les mitochondries ont été marquées spécifiquement au Mitotracker Red. B) L'activité cytotoxique des protéines de fusion a été quantifiée sur la base de critères morphologiques (condensation des cellules) par microscopie de fluorescence, 48 heures après transfection pour la GFP seule (A), ou les protéines de fusion MG-GFP (B) ou GFP-MG (C).

Il est intéressant de noter que les cellules exprimant cette nouvelle protéine de fusion GFP-MG présentent uniquement deux types de morphologies. Les cellules sont étalées, et tout à fait comparables aux cellules non transfectées, ou les cellules sont complètement

condensées. L'absence de stade intermédiaire observable indique que l'exécution de la mort cellulaire induite par la mitogaligine nucléaire est très rapide.

III.2 Stabilité de la mitogaligine

L'activité cytotoxique de la mitogaligine dans les protéines de fusion pouvant également être influencée par sa stabilité, l'intégrité des protéines de fusion GFP-MG et MG-GFP a été vérifiée par western blot à partir de lysats de cellules transfectées, cultivées en présence ou en absence d'un inhibiteur du protéasome, le MG132 (Lee et Goldberg, 1998). Une seule bande est détectée dans le cas des cellules exprimant la fusion mitochondriale MG-GFP lorsque les cellules sont cultivées en absence de l'inhibiteur (figure 39.A). Cette bande correspond à une protéine d'une taille légèrement supérieure à la taille de la GFP seule (27 kDa), mais sa taille est inférieure à la taille attendue (38 kDa). D'autre part, cette bande est uniquement détectée à l'aide d'un anticorps anti-GFP (figure 39.A), et n'est pas révélée lorsque le sérum anti-mitogaligine est employé (figure 39.B). Cette bande légèrement supérieure à 28 kDa, détectée dans les lysats de HeLa exprimant MG-GFP, correspond probablement à une forme tronquée de MG-GFP.

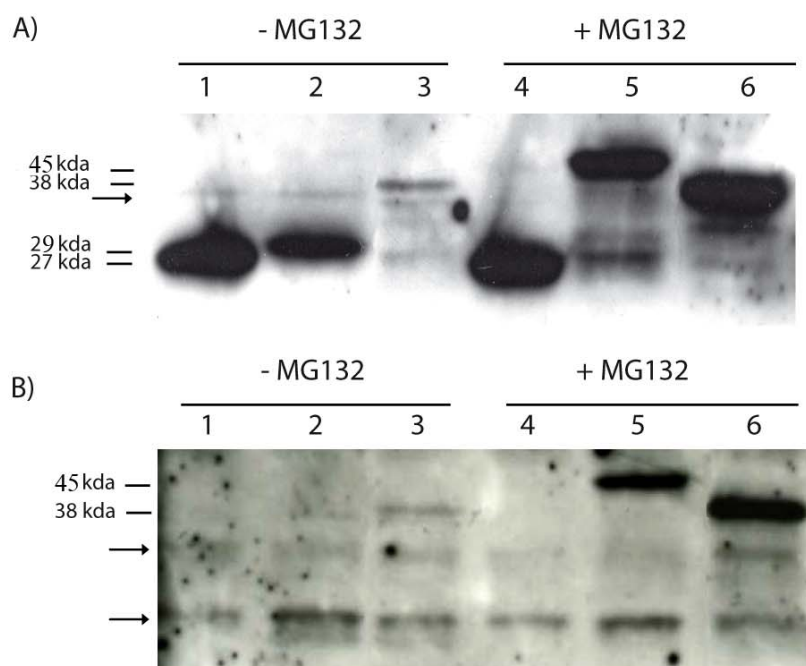


Figure 39. Détection des protéines de fusion MG-GFP et GFP-MG à partir de lysats de cellules HeLa transfectées. Les lysats de HeLa exprimant de façon transitoire la GFP (1 et 4), les protéines de fusion MG-GFP (2 et 5) ou GFP-MG (3 et 6) ont été soumis à une détection par western-blotting contre la GFP (A) ou la mitogaligine (B). Les cellules ont été cultivées en absence (1,2,3) ou en présence (4,5,6) de 10 μ M de MG132, un inhibiteur du protéasome. Les flèches indiquent des bandes non spécifiques.

La protéine de fusion GFP-MG est détectée à la fois par l'anticorps anti-GFP et l'anticorps anti-mitogaligine à une taille correcte d'environ 38 Kda en absence de MG132 (figure 39.A,B), ce résultat suggère que cette protéine est plus stable que MG-GFP. Le niveau d'expression de GFP-MG est faible cependant, ce qui peut être lié à ses effets cytotoxiques.

En présence de MG132, les protéines de fusion MG-GFP et GFP-MG sont détectées par l'anticorps anti-GFP (figure 38.A), et l'anticorps anti-mitogaligine (figure 38.B), ce qui indique que les protéines sont stabilisées en présence de l'inhibiteur du protéasome. Cependant, alors que la fusion GFP-MG est révélée à la taille attendue (38 kDa), MG-GFP est cette fois détectée à une taille supérieure d'une dizaine de kilodaltons à sa taille prédite (environ 49 kDa). Cette différence de taille pourrait notamment être cohérente avec des modifications post-traductionnelles telles que la mono-ubiquitylation ou la sumoylation.

Ces résultats indiquent d'une part, que ces protéines de fusion sont toutes deux dégradées par le protéasome, mais qu'elles présentent des durées de vie différentes, ce qui est probablement à mettre en relation avec leurs localisations. D'autre part, la dégradation de MG-GFP est partielle, et doit s'effectuer après son arrivée à la mitochondrie, puisque la fluorescence issue de la GFP est localisée au niveau des mitochondries dans les cellules exprimant MG-GFP. La dégradation plus rapide de la MG-GFP pourrait expliquer que cette fusion n'induit pas la mort cellulaire lorsqu'elle est exprimée de façon transitoire.

III.3 Caractérisation de l'adressage nucléaire de la mitogaligine

Comme le démontrent les résultats précédents, l'adressage de la mitogaligine est influencé par la position de la GFP dans les protéines de fusions. Alors que le signal d'adressage mitochondrial de la mitogaligine a été identifié précédemment (Duneau et al., 2005), le signal d'adressage nucléaire de la mitogaligine est encore en cours d'étude en raison de sa complexité. Il pourrait en effet être étendu sur deux ou trois régions de la protéine (étude en cours au laboratoire). Certains éléments de réponse laissent cependant penser que l'adressage nucléaire est impliqué dans la fonction biologique de la mitogaligine.

a) Influence des protéines fluorescentes fusionnées à la mitogaligine sur son adressage.

La localisation de la mitogaligine est modifiée selon la position de la GFP dans les protéines de fusion GFP-MG et MG-GFP. Afin de vérifier que la GFP n'est pas en elle-même impliquée dans l'adressage de la mitogaligine, les plasmides codant pour les protéines de fusion MG-GFP et GFP-MG ont été modifiés en substituant la séquence codante pour la GFP

par la séquence de la DsRed (figure 40). Tout comme la forme MG-GFP, la protéine de fusion MG-DsRed est localisée aux mitochondries.

La localisation de la protéine de fusion DsRed-MG ne peut être déterminée car aucune fluorescence ne peut être détectée dans les cellules transfectées. Un défaut conformation de la DsRed dans cette protéine de fusion pourrait être à l'origine de ce résultat. Curieusement cependant, lorsque les cellules sont transfectées par un plasmide codant pour une double fusion DsRED-MG-GFP, la fluorescence de la DsRED ne peut être observée, mais la fluorescence de la GFP issue de cette fusion est visible dans le noyau (figure 40). Ce résultat indique que la DsRed, bien que non fonctionnelle, affecte l'adressage de la mitogaligine de la même façon que la GFP.

	1	2
pMG-GFP		
pMG-DsRed		
pGFP-MG		
pDsRed-MG		
pDsRed-MG-GFP		
pGFP-MG-DsRed		

Figure 40. Influence de la GFP et de la DsRed sur l'adressage de la mitogaligine. Des protéines de fusions comportant la GFP et/ou la DsRed en N-terminal et/ou en C-terminal de la mitogaligine ont été transitoirement exprimées dans des cellules HeLa. Les cellules transfectées ont été observées par microscopie de fluorescence afin de déterminer la localisation des protéines de fusion. Les colonnes 1 et 2 présentent les images issues de la fluorescence émise par la protéine fluorescente placée à l'extrémité N-terminale, ou à l'extrémité C-terminale de la mitogaligine respectivement. Les cases sont grisées lorsqu'aucune fluorescence n'est attendue. Les cases cochées indiquent qu'aucune fluorescence n'est observable.

Par conséquent, bien que l'adressage nucléaire de la mitogaligine soit influencé par la présence de ces protéines fluorescentes, il repose sur une séquence interne à la mitogaligine.

b) Un transport actif vers le noyau

La taille de la protéine de fusion GFP-MG est d'environ 38 Kda, ce qui l'autorise théoriquement à diffuser librement à travers le pore nucléaire. Cependant, cette possibilité ne permet pas d'exclure la dépendance de l'adressage nucléaire de la mitogaligine vis à vis des systèmes de transport nucléaires dépendants de l'ATP, puisque la protéine de fusion s'accumule dans les noyaux. Afin d'évaluer la contribution de ces systèmes dans l'adressage nucléaire de la mitogaligine, des cellules HeLa, transfectées par le plasmide codant la fusion GFP-MG, ont été cultivées en absence ou en présence d'azide de sodium (NaN_3), un inhibiteur de la synthèse d'ATP. La fluorescence issue de la GFP demeure dans les noyaux durant toute la durée de l'expérience lorsque les cellules sont cultivées en absence de NaN_3 (figure 41).

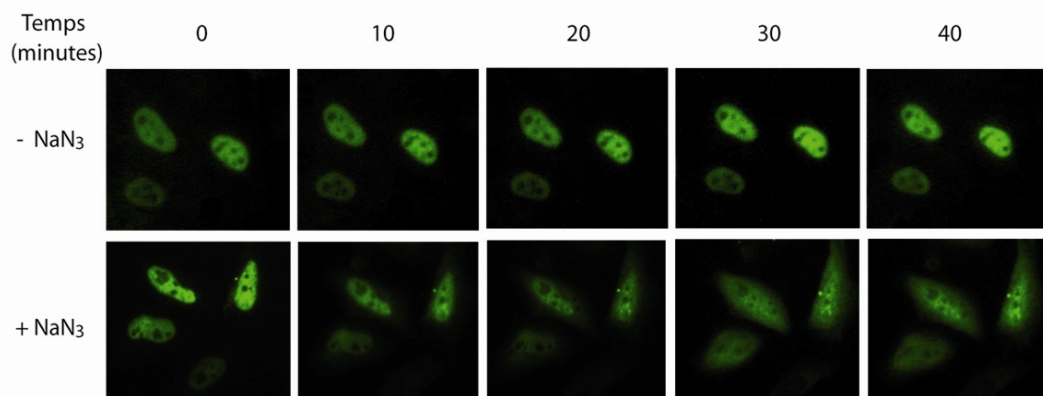


Figure 41. Dépendance de l'adressage nucléaire de la mitogaligine vis-à-vis de l'ATP. Des cellules HeLa exprimant de façon transitoire la protéine de fusion GFP-MG ont été cultivées en absence, ou en présence d'azide de sodium (NaN_3) et ont été observées à différents temps par microscopie de fluorescence.

Lorsque l'inhibiteur est ajouté aux cellules, la fluorescence initialement localisée dans les noyaux des cellules transfectées décroît dans le noyau, et augmente dans le cytoplasme, ce qui indique que GFP-MG ressort du noyau. Ce résultat pourrait indiquer que l'adressage de la mitogaligine vers le noyau soit dépendant d'un système de transport nucléaire actif. Alternativement, la protéine pourrait entrer par diffusion passive dans le noyau, mais son maintien dans ce compartiment pourrait nécessiter de l'ATP.

c) Interaction des peptides dérivés de la mitogaligine avec de l'ADN

Afin d'évaluer les capacités d'interaction de la mitogaligine avec l'ADN, les peptides MG 12-34, MG 31-53 et MG 55-75 ont été incubés en concentrations croissantes avec une quantité constante d'un ADN plasmidique puis, le retard de migration du plasmide dans un gel d'agarose a été évalué dans chaque condition (figure 42). Aucun changement dans la migration du plasmide n'est observé lorsqu'il est placé en présence du peptide MG 55-75, un léger retard est en revanche observé lorsque le plasmide est incubé avec le peptide MG 12-34 à une concentration supérieure ou égale à 56 μM .

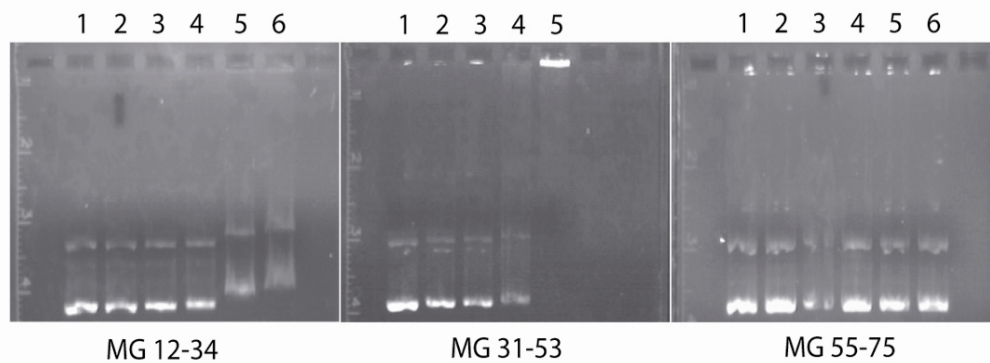


Figure 42. Interaction des peptides dérivés de la mitogaligine avec de l'ADN. Les peptides MG 12-34, MG 31-53 ou MG 55-75 ont été incubés en concentrations croissantes (1 : 0 μM , 2 : 7 μM , 3 : 14 μM , 4 : 28 μM , 5 : 56 μM , 6 : 104 μM) avec une quantité constante de plasmide (600ng). La migration de l'ADN est visualisée dans chaque cas.

Le peptide MG 31-53 ne modifie pas la migration du plasmide jusqu'à une concentration de 28 μM , mais empêche le plasmide de migrer dans le gel pour une concentration de 56 μM , ce qui suggère que le peptide induit de façon coopérative la formation d'agrégats d'ADN de taille importante. La région centrale de la mitogaligine couverte par le peptide MG 31-53 est insuffisante pour adresser la mitogaligine au noyau (en cours d'étude), mais ces résultats suggèrent qu'elle puisse contribuer au maintien de la mitogaligine dans ce compartiment sa capacité d'interaction avec l'ADN.

III.4 La forme native de la mitogaligine est adressée aux mitochondries

La mitogaligine peut être adressée à la mitochondrie ou au noyau lorsqu'elle est en fusion avec la GFP. Afin de déterminer la localisation de la forme native de la mitogaligine, un protocole de marquage de la mitogaligine par immunofluorescence a été établi. Les conditions de marquage ont été contrôlées à partir de cellules HeLa transfectées par les plasmides codant GFP-MG ou MG-GFP. Ces cellules ont été marquées à l'aide d'un sérum

issu d'un lapin immunisé contre la mitogaligine (figure 43). Alors que la mitogaligine dans la fusion GFP-MG est reconnue par les anticorps dans les noyaux, et faiblement dans les mitochondries, la fusion mitochondriale MG-GFP n'est pas détectable. Ceci pourrait être lié à sa dégradation rapide (figure 43.A).

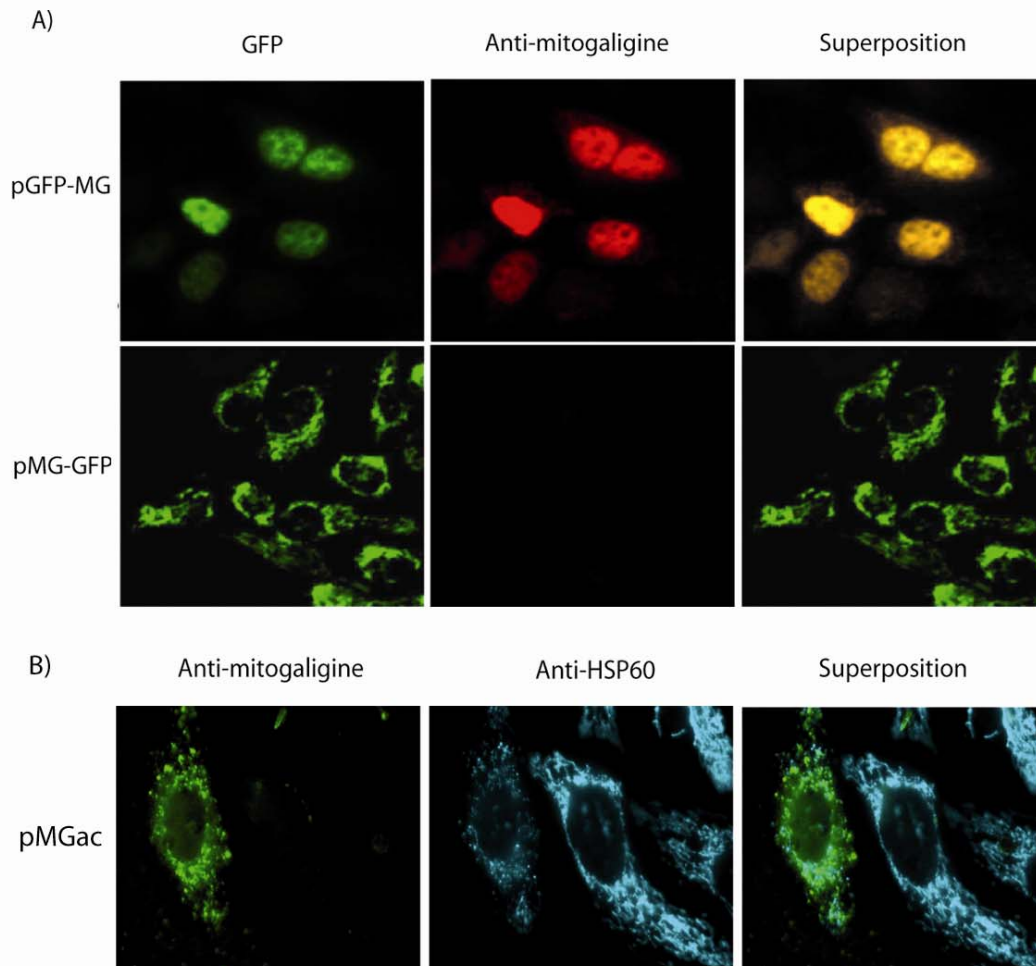


Figure 43. Détection de la mitogaligine par immunofluorescence. A) Le contrôle des conditions de marquage par immunofluorescence de la mitogaligine a été réalisé sur des cellules HeLa transfectées par les plasmides codant pour les protéines de fusion MG-GFP ou GFP-MG. Le signal issu de la reconnaissance de la protéine par les immunoglobulines apparaît en rouge (cyanine-3). B) Le plasmide pMGac codant pour la mitogaligine non fusionnée a été introduit dans des cellules HeLa, et la localisation de la protéine a été déterminée par immunofluorescence. Le signal issu de la détection de la mitogaligine apparaît en vert (FITC). Une protéine mitochondriale, HSP60, a également été marquée et apparaît en bleu (cyanine-5)

Ces conditions de marquages ont ensuite été appliquées à la détection de la forme non fusionnée de la mitogaligine. Des cellules HeLa transfectées par le plasmide pMGac, codant seulement pour la mitogaligine, ont été marquées à l'aide du sérum anti-mitogaligine (figure 43.B). Dans ce cas, la protéine est détectée dans les mitochondries des cellules HeLa comme

l'indique la colocalisation du marquage de la mitogaligine avec celui d'HSP60, une protéine mitochondriale.

Il est important de remarquer que le réseau mitochondrial est déstructuré dans les cellules exprimant de façon transitoire la mitogaligine. Son aspect est en effet ponctiforme, alors qu'il est tubulaire dans les cellules n'exprimant pas la mitogaligine. Ces observations suggèrent que la forme native de la protéine est adressée aux mitochondries, et que sa présence dans ce compartiment altère le réseau mitochondrial.

III.5 Caractérisation de la mort cellulaire induite par la mitogaligine

a) Des caractéristiques morphologiques dépendantes de l'activation des caspases

Des cellules HeLa ont été transfectées par les plasmides pGFP ou pGFP-MG codant pour la GFP seule ou par la protéine de fusion GFP-MG, et ont été observées par microscopie. Alors que les cellules exprimant la GFP sont en grande majorité étalées, deux types de morphologies sont principalement observables parmi les cellules exprimant GFP-MG. Les cellules vivantes sont étalées sur le support de culture et les cellules mortes sont complètement condensées (figure 44.A).

Après 24H, 50% des cellules transfectées présentent un aspect condensé et vésicularisé. Cette proportion augmente jusqu'à 90% après 48 heures, alors que seulement 30% des cellules exprimant la GFP seule sont condensées (figure 44.B). L'absence de cellules présentant une morphologie intermédiaire entre ces deux stades suggère que le processus d'exécution de la mort cellulaire induit par la mitogaligine est extrêmement rapide. Lorsque les cellules transfectées sont incubées en présence de zVAD-fmk, un inhibiteur général des caspases, elles présentent cependant une morphologie intermédiaire située entre la forme complètement étalée des cellules vivantes et la forme condensée des cellules mortes 24 heures après transfection (figure 44.B). Les cellules sont en effet légèrement moins étalées. D'autre part, alors que 50% des cellules transfectées exprimant GFP-MG meurent dans les 24 heures succédant la transfection, seulement quelques pourcents des cellules meurent lorsqu'elles sont cultivées en présence de zVAD-fmk (figure 44.A). Ces observations indiquent que la mort cellulaire est partiellement inhibée dans ces conditions.

Cet effet s'atténue au cours des 24 heures suivantes, puisque les cellules exprimant GFP-MG s'arrondissent malgré la présence de l'inhibiteur, et que la mortalité des cellules transfectées est seulement réduite d'approximativement 50%, 48 heures après transfection. Cette diminution de l'effet inhibiteur du zVAD-fmk au-delà de 24 heures pourrait s'expliquer

par une réduction de sa disponibilité, ou par le glissement du processus cytotoxique vers une mort cellulaire indépendante des caspases (Denecker et al., 2001; Yu et al., 2004).

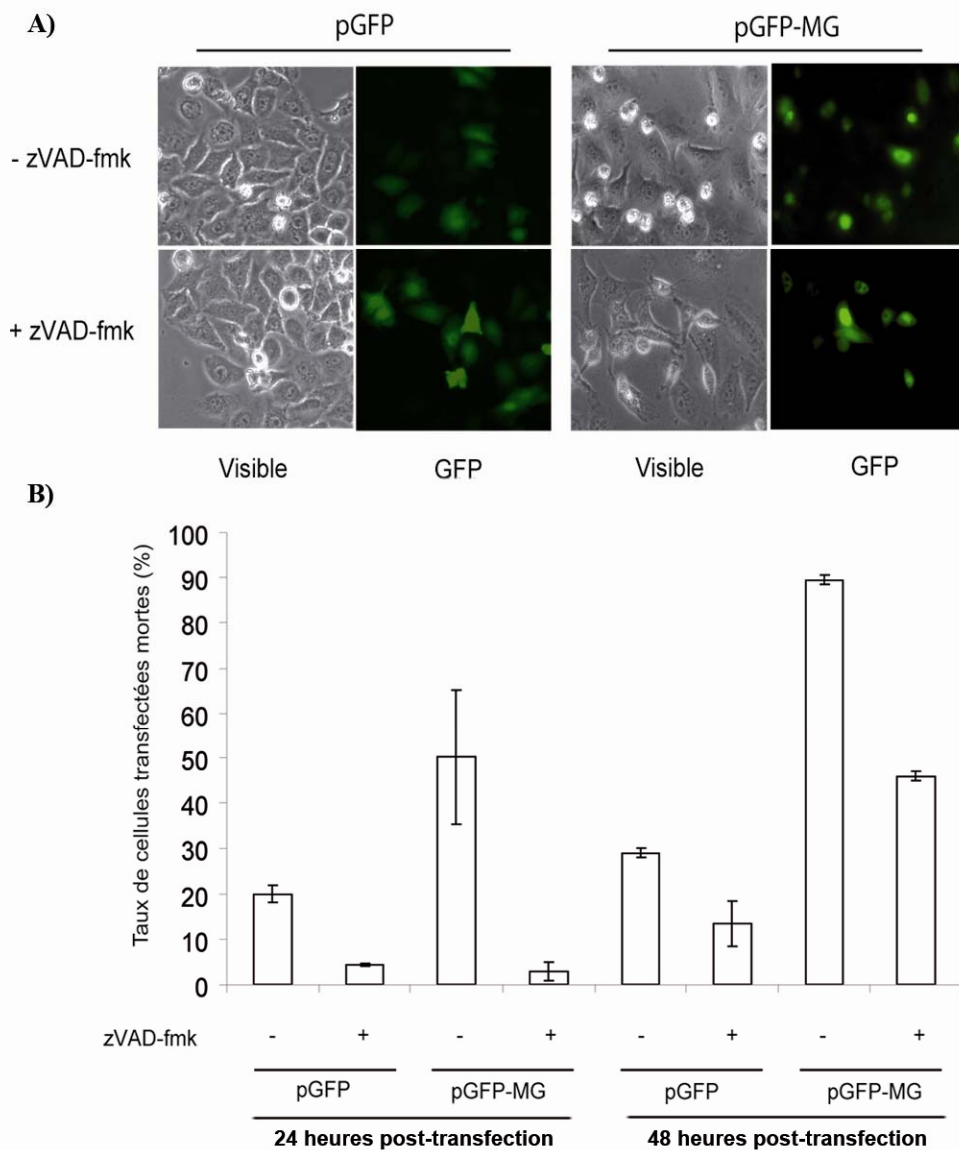


Figure 44. Effets du zVAD-fmk sur la cytotoxicité de la mitogaligine. A) Morphologie représentative des cellules en culture exprimant la GFP seule ou la fusion GFP-MG en absence ou en présence de zVAD-fmk. Les cellules ont été observées par microscopie visible et par microscopie de fluorescence. B) Le taux de mortalité des cellules exprimant la fusion GFP-MG a été quantifié en absence (-) ou en présence (+) de zVAD-fmk après 24 ou 48 heures. Le taux de mortalité des cellules exprimant la GFP est indiqué en contrôle à 24 heures ou à 48 heures en absence ou en présence de l'inhibiteur.

b) Une altération de la chromatine

L'ADN des cellules exprimant la GFP est coloré par le Hoechst de façon homogène dans les noyaux et aucune altération de la morphologie nucléaire n'est observable en absence ou en

présence de zVAD-fmk (figure 45). Bien que les cellules étalées exprimant GFP-MG présentent les mêmes caractéristiques, la chromatine des cellules condensées exprimant cette protéine de fusion présentent un caractère pycnotique comme l'indique l'observation de plusieurs masses très compactes d'ADN (figure 45).

Cette altération de la chromatine est très atténuée lorsque ces cellules sont cultivées en présence de zVAD-fmk. Dans ces conditions, la chromatine est encore condensée, cependant la formation de masses compactes d'ADN est inhibée. Ces observations indiquent que l'atteinte de la chromatine au cours de la mort cellulaire induite par la mitogaligine est en partie dépendante de l'activation des caspases.

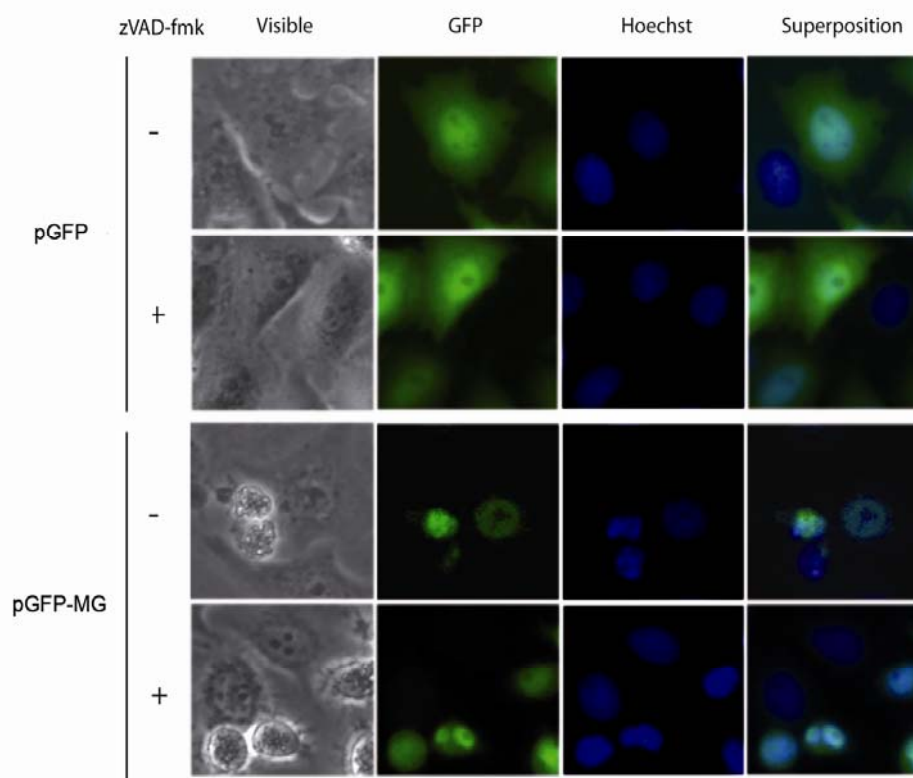


Figure 45. Altération de la chromatine. L'ADN de cellules exprimant la GFP ou la fusion GFP-MG a été coloré au Hoechst et son état morphologique a été observé par microscopie visible et par microscopie de fluorescence. Les cellules ont été cultivées en absence (-) ou en présence (+) de zVAD-fmk.

Le marquage TUNEL a également été employé afin de détecter la présence de coupures dans l'ADN. Ce marquage est négatif dans les cellules contrôle exprimant la GFP et les cellules encore étalées exprimant GFP-MG 48 heures après transfection (figure 46 A,B). En revanche, le marquage est positif dans les cellules condensées exprimant GFP-MG, ce qui indique que l'ADN y est dégradé. Seulement 13 % des cellules exprimant la GFP présentent un marquage TUNEL contre 60% dans le cas des cellules exprimant GFP-MG.

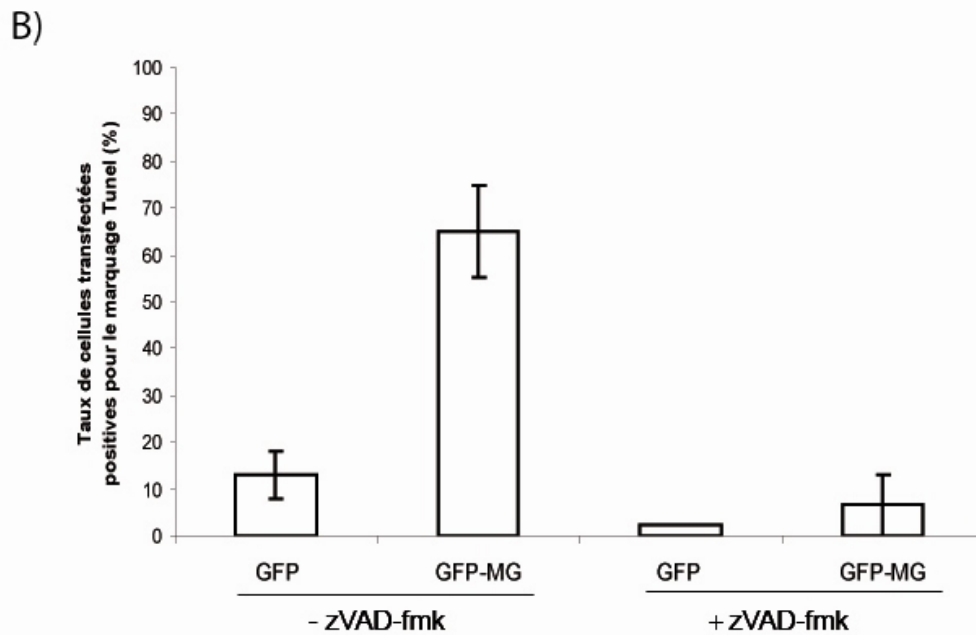
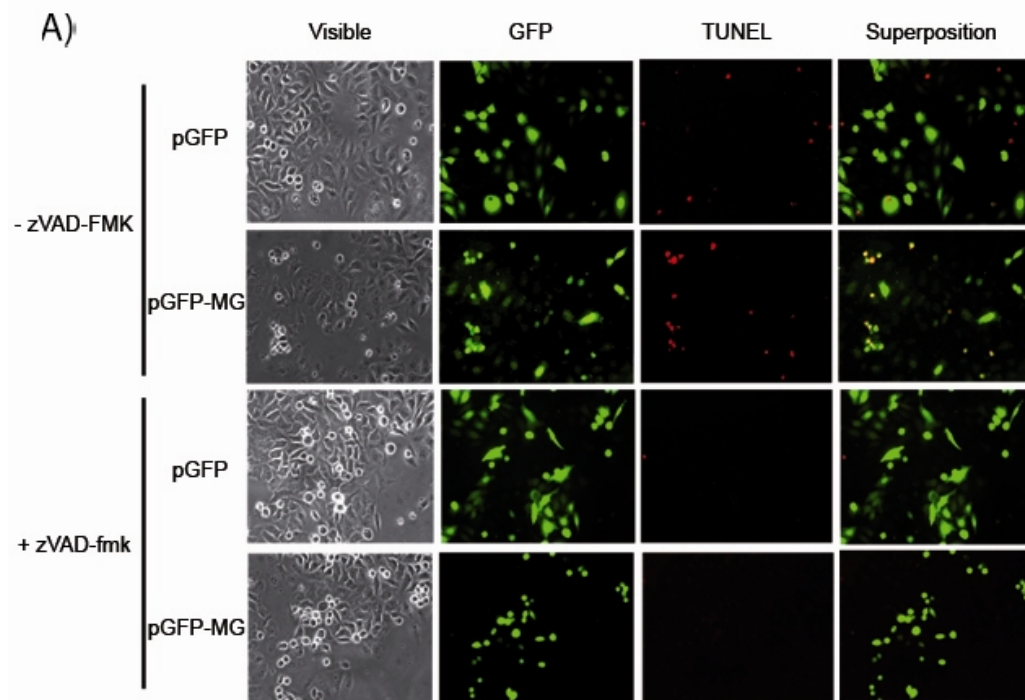


Figure 46. Détection des coupures dans l'ADN. Le marquage TUNEL a été réalisé sur des cellules exprimant de façon transitoire la GFP ou la protéine de fusion GFP-MG. Les cellules ont été cultivées en absence ou en présence de zVAD-fmk. A) Les cellules ont été observées par microscopie visible et par microscopie de fluorescence 48 heures après transfection. B) Le pourcentage de cellules transfectées positives pour le marquage TUNEL est représenté dans chaque cas en absence ou en présence de zVAD-fmk.

En présence de zVAD-fmk, moins de 10 % des cellules exprimant GFP-MG cultivées en présence de zVAD-fmk présentent un marquage TUNEL, ce qui démontre que l'ADN est préservé lorsque les caspases sont inhibées (figure 46.A,B). Par conséquent, l'endommagement de l'ADN dans les cellules exprimant GFP-MG ne dépend pas directement de l'activité de la mitogaligine, mais succède à l'activation des caspases.

c) Activation des caspases

- **Test d'activité de la caspase 2**

Afin d'identifier les caspases, et les voies d'activation impliquées dans l'apoptose induite par GFP-MG, l'activation de différentes caspases a été évaluée. En raison de la localisation principalement nucléaire de la fusion GFP-MG, l'implication de la caspase 2 a été testée. En effet, cette caspase initiateur joue un rôle important dans l'induction de l'apoptose à partir du noyau sous l'effet de stress génotoxiques (Zhivotovsky et Orrenius, 2005). Le taux de mortalité des cellules transfectées a été déterminé sur la base de critères morphologiques de la même façon que précédemment, à partir de cellules cultivées en absence ou en présence de zVDVAD-fmk, un inhibiteur de la caspase 2 (figure 47) (Talanian et al., 1997).

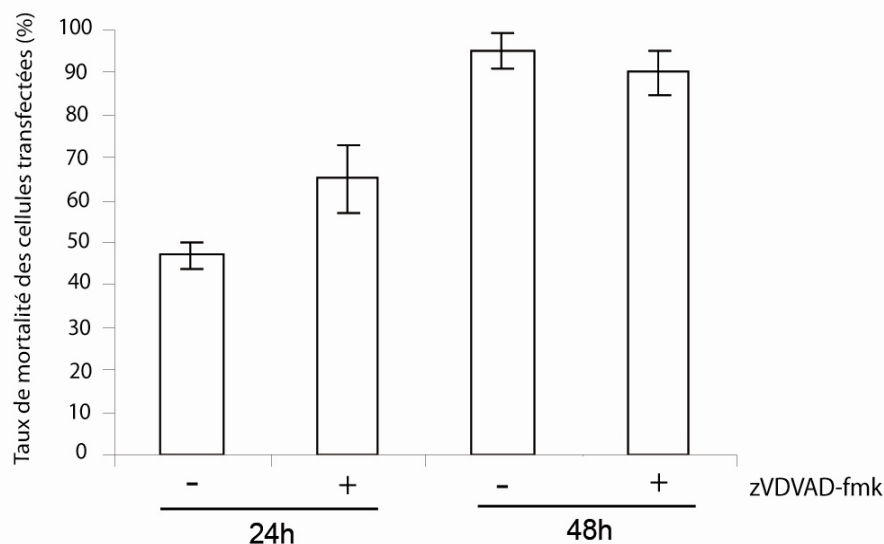


Figure 47. La caspase 2 n'intervient pas dans l'apoptose induite par la mitogaligine. Des cellules HeLa transfectées par pGFP-MG ont été cultivées en absence (-) ou en présence (+) de zVDVAD-fmk, un inhibiteur spécifique de la caspase 2. Le taux de mortalité des cellules transfectées a été quantifié par microscopie visible et par microscopie de fluorescence à 24 et 48 heures post-transfection.

En absence de zVDVAD-fmk, le taux de mortalité des cellules exprimant GFP-MG est d'environ 50 %, et 95 % après 24 et 48 heures post-transfection respectivement. En présence de zVDVAD-fmk, ces taux sont peu modifiés (figure 47). Après 24 heures, le taux de mortalité est légèrement supérieur à 60 %, et il atteint environ 90 % 48heures post-transfection. D'autre part, les cellules transfectées cultivées en présence de zVDVAD-fmk présentent une morphologie identique aux cellules cultivées en absence de l'inhibiteur (non montré). Les cellules sont étalées ou totalement condensées, aucun stade intermédiaire entre ces deux types de morphologies n'est observable. Contrairement au zVAD-fmk, le zVDVAD-fmk n'influence pas le déroulement de la mort cellulaire induite par la mitogaligine nucléaire, la caspase 2 n'est donc pas impliquée dans son induction.

- **Test d'activité de la caspase 3**

L'activation de la caspase 3 exécitrice a été évaluée à l'aide d'un substrat fluorogénique spécifique de cette enzyme. Les cellules HeLa transfectées incubées avec ce substrat, ont été observées par microscopie de fluorescence. Alors qu'aucune fluorescence issue du substrat fluorogénique n'est observable dans les cellules non transfectées ou exprimant la GFP seule, les cellules transfectées par le plasmide codant pour la fusion GFP-MG présentent une fluorescence rouge issue du clivage du substrat par la caspase 3 (figure 48.A). Près de 85 % des cellules exprimant la fusion GFP-MG présentent ce marquage après 48 heures (figure 48.B). Il est à noter cependant qu'il est uniquement visible dans les cellules transfectées fortement condensées, ce qui suggère que l'activation des caspases induit une transition rapide de la morphologie des cellules. Ce marquage est absent des cellules exprimant la GFP seule en absence ou en présence de zVAD-fmk, ou les cellules exprimant GFP-MG cultivées en présence de zVAD-fmk. Ce résultat indique que la caspase 3 est activée au cours de l'apoptose induite par la mitogaligine, et implique la voie apoptotique intrinsèque dans la mort cellulaire induite par la mitogaligine.

d) La mitogaligine induit une fuite de cytochrome c

La fuite du cytochrome c de la mitochondrie vers le cytoplasme constitue un évènement central dans l'induction de l'apoptose, en participant à la formation de l'apoptosome et à l'activation consécutive des caspases 9, 3 et 7. C'est pourquoi la libération de cytochrome c sous l'effet de GFP-MG a été évaluée. Dans ce but, la localisation du cytochrome c a été visualisée par immunofluorescence à partir de cellules HeLa transfectées (figure 49).

Dans les cellules exprimant la GFP seule, le marquage du cytochrome c présente un aspect tout à fait identique à celui des cellules non transfectées dans le même puits, le cytochrome c est marqué à travers le réseau mitochondrial.

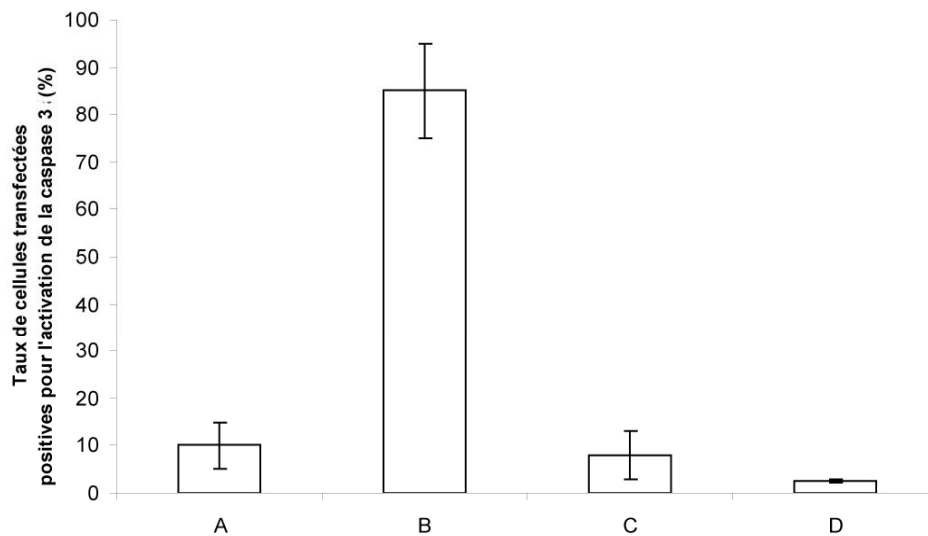
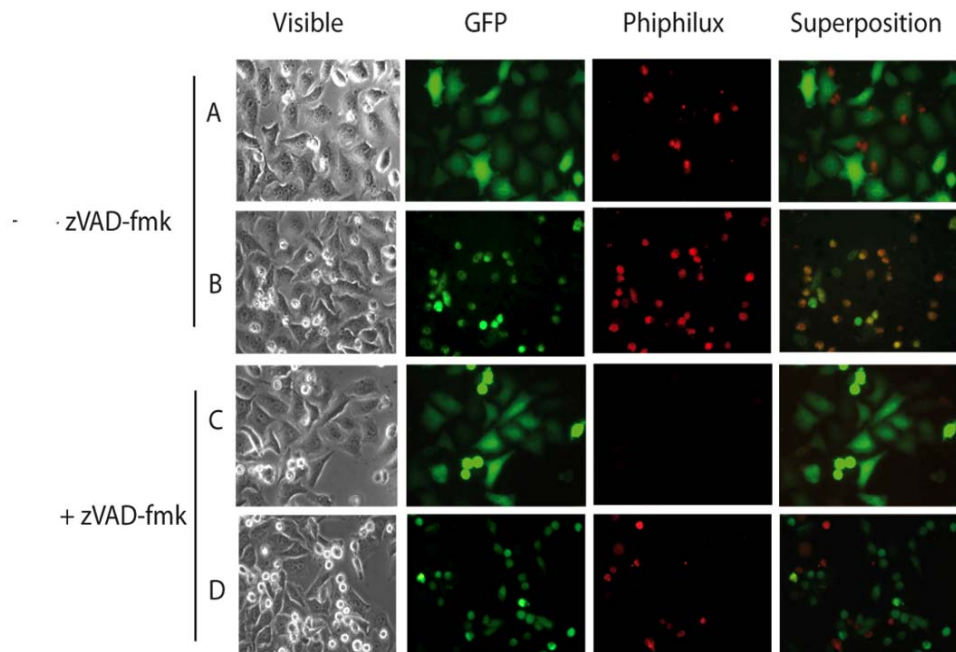


Figure 48. Activation de la caspase 3. 1) Des cellules HeLa transfectées par les plasmides codant la GFP seule (A,C) ou la protéine de fusion GFP-MG (B,D) ont été cultivées en absence (-) ou en présence (+) de zVAD-fmk. 48 heures post-transfection, les cellules ont été incubées avec un substrat spécifique de la caspase 3 (Phiphilux), et ont été observées par microscopie de fluorescence. 2) Les taux de cellules transfectées présentant un marquage positif pour l'activité de la caspase 3 sont indiqués dans l'histogramme.

Le même résultat est observable dans les cellules étalées exprimant la protéine de fusion GFP-MG. Cependant, il est difficile de déterminer la localisation du cytochrome c dans les cellules mortes en raison de leur condensation.

Le résultat est différent lorsque le marquage est effectué sur des cellules exprimant la protéine de fusion GFP-MG cultivées en présence de zVAD-fmk. Une localisation diffuse du cytochrome c dans la cellule, caractéristique de son relargage massif, est observée dans les cellules transfectées présentant un état morphologique intermédiaire situé entre les cellules totalement étalées et les cellules condensées. Ce résultat est indépendant de l'inhibiteur puisque le cytochrome c reste localisé dans les mitochondries des cellules exprimant la GFP seules cultivées en présence de zVAD-fmk. La voie de signalisation de l'apoptose induite par la mitogaligine passe par conséquent par l'altération de la perméabilité des mitochondries, et la fuite de cytochrome c.

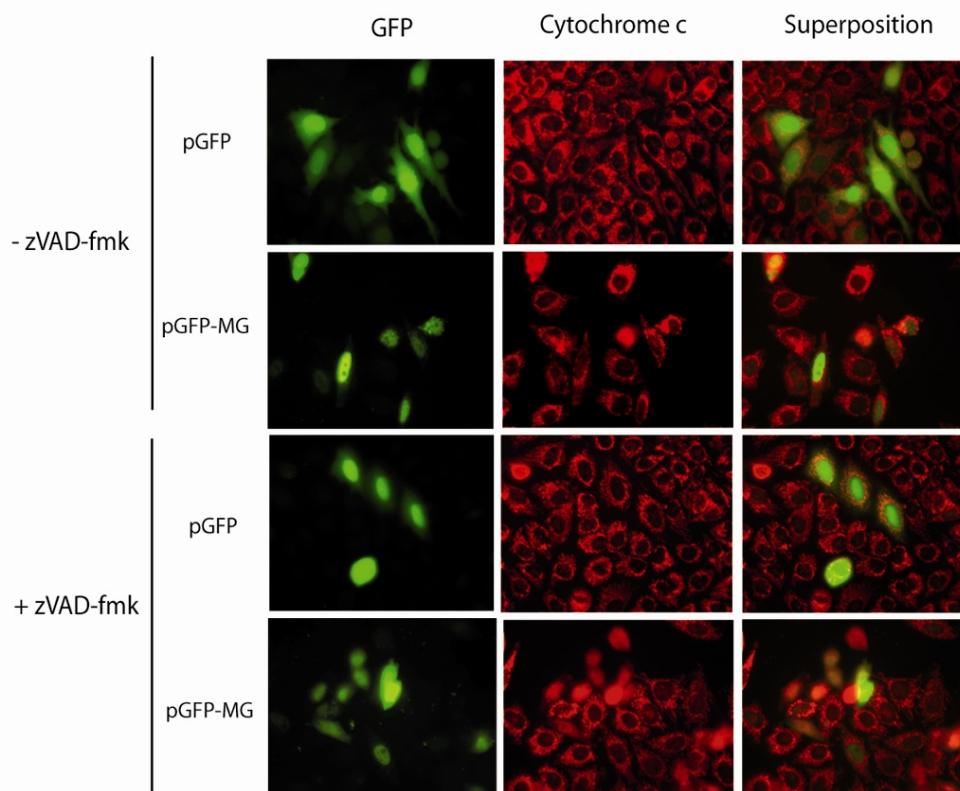


Figure 49. Libération du cytochrome c. Le marquage du cytochrome c par immunofluorescence a été réalisé sur des cellules HeLa transfectées par le plasmide pGFP ou pGFP-MG, 24 post-transfection. Les cellules ont été cultivées en présence ou en absence de zVAD-fmk.

e) Une perte tardive du potentiel transmembranaire mitochondrial

Le potentiel transmembranaire mitochondrial, établi à travers la membrane interne des mitochondries, participe à la fonction bioénergétique des mitochondries. Il est généré par un gradient de protons en excès dans l'espace inter-membranaire et en défaut dans la matrice.

En raison de sa sensibilité vis-à-vis de la perméabilité de la membrane externe des mitochondries, ce potentiel constitue un indicateur de leur altération (Scaduto et Grotyohann, 1999). Afin d'évaluer sa conservation dans les cellules transfectées, une sonde fluorescente, la Tetra-Methyl Rhodamine Methyl-ester (TMRM), a été employée. Cette molécule s'accumule uniquement dans les mitochondries fonctionnelles sous l'effet du potentiel transmembranaire mitochondrial, et permet ainsi de discriminer les cellules présentant un dysfonctionnement de leurs mitochondries (figure 50).

L'observation des cellules par microscopie de fluorescence, 24 heures après transfection, indique que les cellules HeLa transfectées par pGFP sont marquées au TMRM (figure 50.A). La fluorescence rouge du TMRM apparaît à travers un réseau mitochondrial filamenteux dans le cytoplasme des cellules exprimant la GFP de la même façon que dans les cellules non transfectées. Un résultat similaire est obtenu avec les cellules exprimant la protéine de fusion GFP-MG. Les cellules transfectées étalées présentent en effet un marquage des mitochondries au TMRM. Les observations sont plus hétérogènes dans le cas des cellules condensées exprimant GFP-MG. Alors que certaines cellules mortes sont encore marquées, d'autres sont complètement dépourvues de marquage au TMRM. Ce résultat suggère que la perte du potentiel transmembranaire mitochondrial succède tardivement à l'altération morphologique des cellules par les caspases, au cours de l'apoptose induite par la mitogaligine.

Les caspases peuvent induire la dépolarisation des mitochondries (Marzo et al., 1998), afin d'évaluer leur implication dans cet événement, l'expérience a également été réalisée en présence de zVAD-fmk. L'inhibiteur n'altère pas la fonction bioénergétique des mitochondries dans ces conditions expérimentales. Les cellules exprimant la GFP, ainsi que les cellules non-transfectées dans le même puits, sont en effet marquées au TMRM. Les mitochondries des cellules étalées exprimant GFP-MG, cultivées en présence de zVAD-fmk, sont également marquées cependant, une agrégation importante des mitochondries autour du noyau est très fréquemment observée. A nouveau, une partie seulement des cellules condensées produisant GFP-MG n'est plus marquée par le TMRM.

Ces observations indiquent que la dépolarisation des mitochondries au cours de la mort cellulaire induite par la mitogaligine peut s'effectuer indépendamment de l'activité des caspases.

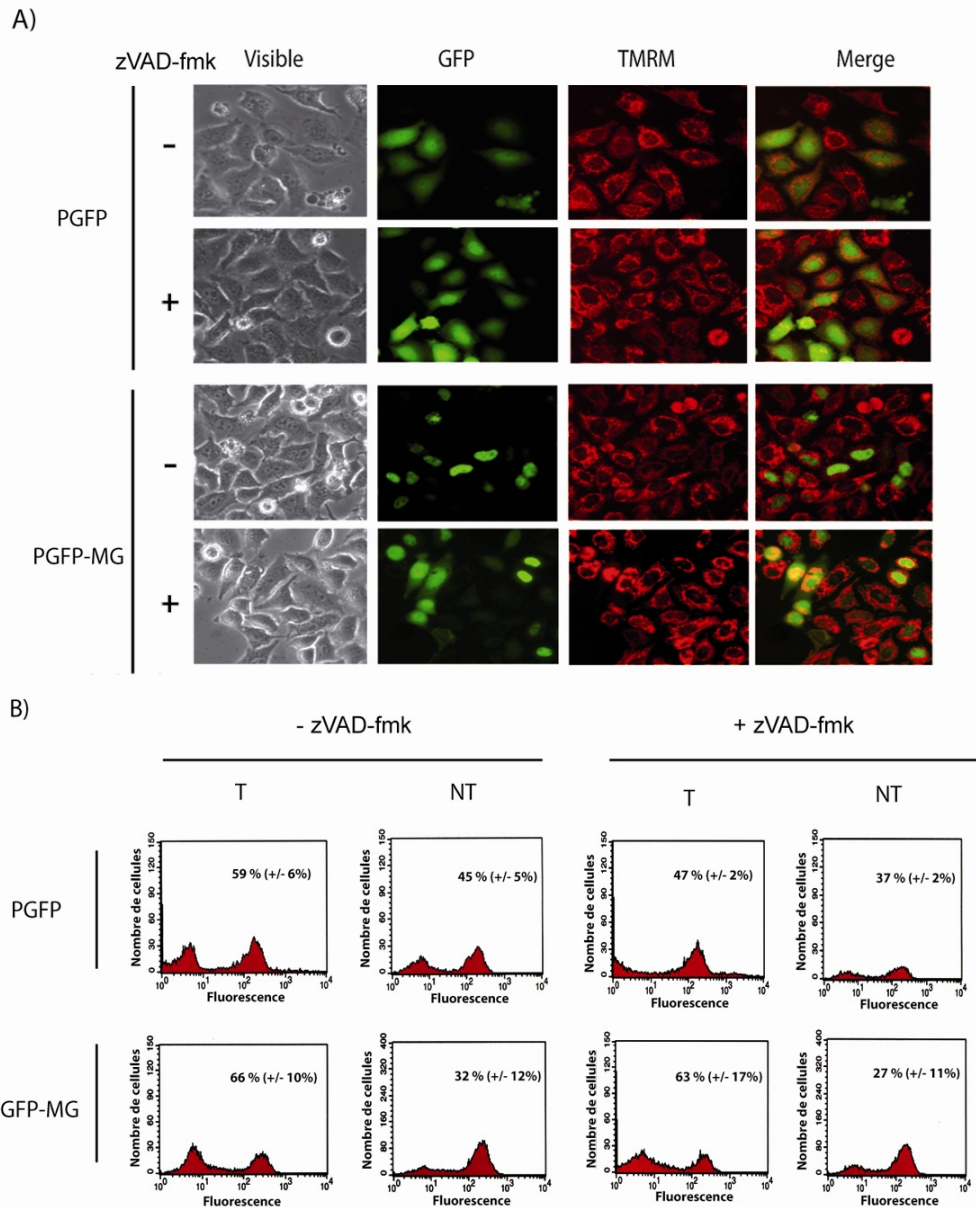


Figure 50. Détection du potentiel transmembranaire mitochondrial. A) Des cellules HeLa transfectées par pGFP ou pGFP-MG ont été cultivées en présence ou en absence de zVAD-fmk. 24 après transfection les mitochondries ont été marquées au TMRM, puis ont été observées par microscopie visible et par microscopie de fluorescence. B) Le taux de cellules négatives pour le marquage au TMRM, quantifié par cytométrie en flux, est indiqué sur les graphes. La quantité de cellules est exprimée en fonction de l'intensité de fluorescence. NT et T désignent respectivement les cellules Non-Transfectées et les cellules Transfectées à l'intérieur d'un même puits.

La réduction du potentiel transmembranaire mitochondrial a également été quantifiée par cytométrie en flux 48 heures post-transfection (figure 50.B). 59 % des cellules transfectées par pGFP un marquage réduit au TMRM contre 45 % des cellules non transfectées (NT) dans le même puits. Parmi les cellules exprimant GFP-MG, 66 % ne sont pas marquées au TMRM contre 32 % des cellules non-transfectées dans le même puits. Par conséquent, l'expression de la GFP ou de GFP-MG augmente de 34 % et de 52 % la population des cellules transfectées non-marquées respectivement. Si ces résultats reflètent approximativement le taux de mortalité des cellules exprimant la GFP quantifié précédemment (figure 38.B), ils n'expliquent pas les 90 % de mortalité des cellules transfectées par pGFP-MG déterminés sur des critères morphologiques. L'opposition apparente de ces résultats pourrait en fait indiquer, à nouveau, que la perte du potentiel transmembranaire mitochondrial est un évènement tardif de l'apoptose induite par la mitogaligine.

f) Activation de Bax au cours de l'apoptose induite par la mitogaligine

Bax est fréquemment impliqué dans le relargage de cytochrome c au cours de l'apoptose. Cette activité est en partie régulée par son adressage. Dans des conditions normales de vie, Bax est principalement localisé dans le cytoplasme, cependant, sous l'effet de stress pro-apoptotiques variés, Bax est redirigé vers les mitochondries après avoir subi des changements conformationnels. La translocation de Bax vers les mitochondries a été évaluée dans cette étude par immunofluorescence, à l'aide de l'anticorps anti-Bax 6A7 (figure 51). Cet anticorps, sensible à la conformation de Bax, reconnaît spécifiquement la forme mitochondriale de la protéine.

Bax n'est pas détecté dans les cellules transfectées par le plasmide codant pour la GFP seule (figure 51.A). En revanche, un marquage périnucléaire de Bax est observé dans les cellules exprimant GFP-MG (figure 51.B). Ce marquage est visible dans les cellules encore étalées, ainsi que dans les cellules mortes ce qui suggère que la translocation de Bax est un évènement précoce de la mort cellulaire induite par la mitogaligine. Cette expérience a également été réalisée à partir de cellules transfectées cultivées en présence de zVAD-fmk. A nouveau aucun marquage de Bax n'est observé dans les cellules exprimant la GFP (figure 51.C). Il peut être constaté cependant, que dans les cellules exprimant la forme nucléaire de la mitogaligine, Bax est détecté autour du noyau (figure 51.D). Bien que ce résultat soit identique au résultat obtenu en absence de zVAD-fmk, l'intensité du signal est légèrement supérieure, ce qui peut traduire une accumulation plus importante de Bax dans les

mitochondries. Bax est donc relocalisé vers les mitochondries au cours de l'apoptose induite par la fusion GFP-MG. De plus cette translocation s'effectue en amont de l'activation des caspases puisqu'elle est observable lorsque les caspases sont inhibées par le zVAD-fmk.

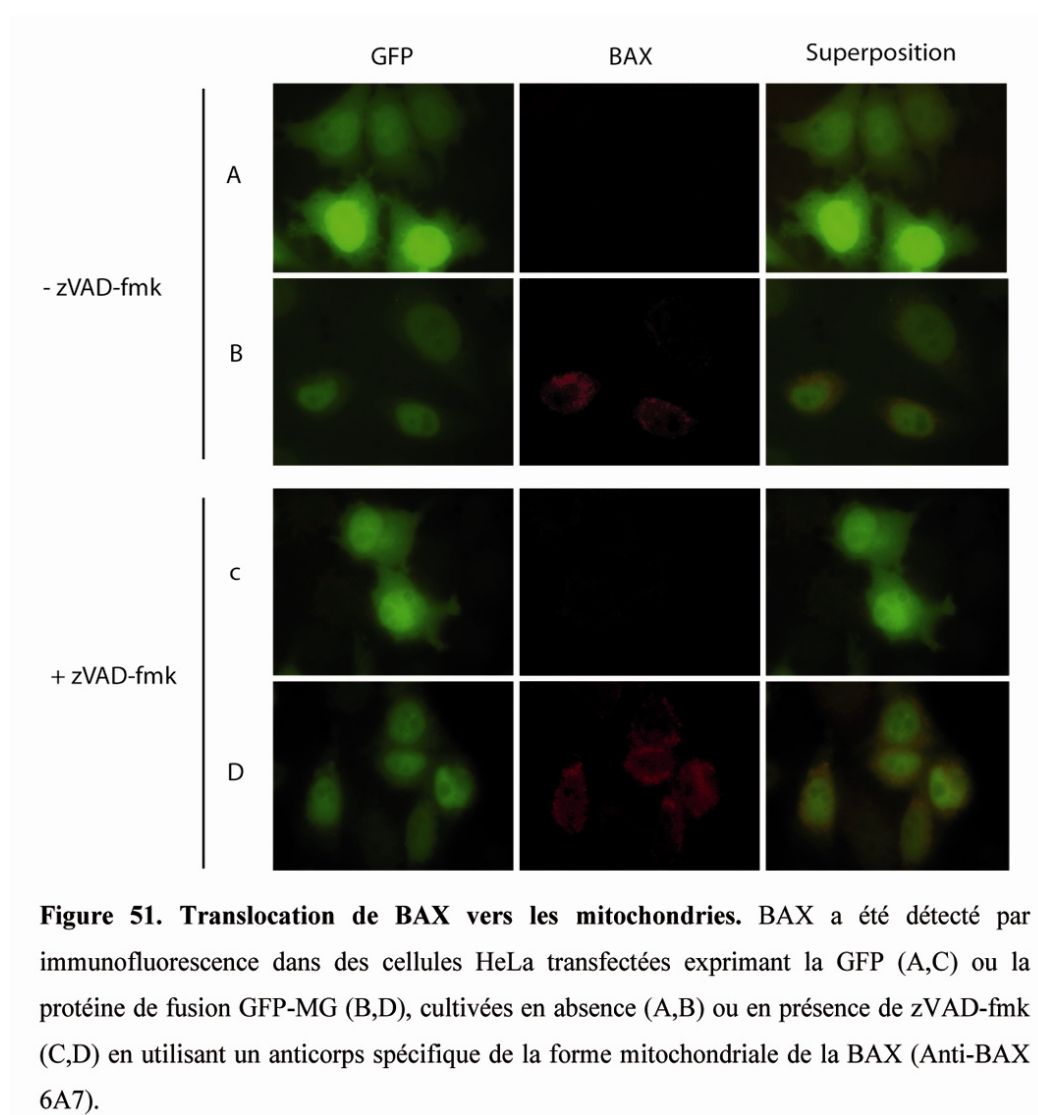


Figure 51. Translocation de BAX vers les mitochondries. BAX a été détecté par immunofluorescence dans des cellules HeLa transfectées exprimant la GFP (A,C) ou la protéine de fusion GFP-MG (B,D), cultivées en absence (A,B) ou en présence de zVAD-fmk (C,D) en utilisant un anticorps spécifique de la forme mitochondriale de la BAX (Anti-BAX 6A7).

Discussion et perspectives

I. La mitogaligine peut déstabiliser la membrane mitochondriale par son interaction avec la cardiolipine

Galig présente une cytotoxicité dont les bases moléculaires ne sont pas encore clairement définies. Les résultats précédents démontrent cependant que l'une des protéines issue de ce gène, la mitogaligine, peut être adressée aux mitochondries et peut induire la fuite d'un facteur pro-apoptotique, le cytochrome c. Dans cette étude, nous nous sommes tout d'abord intéressés au mécanisme permettant à la mitogaligine de perméabiliser les mitochondries. Afin de déterminer si ce mécanisme pouvait directement impliquer la partie lipidique des membranes mitochondriales, et plus particulièrement, la cardiolipine, un phospholipide spécifique des mitochondries; les effets de la mitogaligine sur des membranes synthétiques ont été évalués en utilisant des peptides dérivés de la protéine.

I.1. Une spécificité large pour les phospholipides anioniques, et une préférence pour la cardiolipine

L'étude de l'interaction des peptides dérivés de la mitogaligine avec des membranes lipidiques révèle tout d'abord que les peptides peuvent interagir avec des membranes anioniques contenant de la cardiolipine, alors qu'aucune interaction n'est détectée entre ces peptides, et des membranes globalement neutres (figure 28). Il est important de rappeler que le peptide MG 31-53, qui contient le signal d'adressage mitochondrial, présente l'affinité la plus importante pour les liposomes contenant de la cardiolipine, ce qui laisse penser que l'interaction de cette région de la mitogaligine avec la cardiolipine puisse participer à l'adressage mitochondrial de la protéine. L'implication de la cardiolipine dans l'adressage de protéines mitochondriales a été démontrée dans plusieurs cas (de Kruijff, 1994; Demel et al., 1989; Ou et al., 1988), et ce phospholipide est notamment essentiel à l'adressage mitochondrial de tBid au cours de l'apoptose (Lutter et al., 2000; Lutter et al., 2001).

Les bases moléculaires de l'interaction entre le peptide MG 31-53 et les membranes contenant de la cardiolipine reposent sur des contributions électrostatiques, plutôt que sur des spécificités structurales. L'implication critique des charges a été démontrée en utilisant des peptides dérivés du peptide MG 31-53 (figure 30). La réduction de la charge positive nette à travers les peptides mutants MG 35-53, MG 35-53 S/E, et MG 35-53 TS/EE, s'accompagne d'une diminution progressive de l'affinité des peptides pour des membranes contenant de la

cardiolipine. Le doublet d'arginine 40-41 joue notamment un rôle important dans l'interaction puisque le peptide MG 31-53 RR/AA n'est plus capable d'interagir avec les membranes contenant de la cardiolipine (figure 30).

Cette contribution des charges électrostatiques à l'interaction pourrait expliquer que le peptide MG 31-53 puisse interagir avec différents types de phospholipides anioniques (figure 32). Bien qu'il présente de plus grandes affinités pour la cardiolipine et ses précurseurs métaboliques, l'interaction du peptide avec des liposomes contenant du phosphatidylinositol est encore significative, en revanche, aucune interaction ne peut être détectée avec la phosphatidylsérine. Par homologie, tBid présente une préférence plutôt qu'une spécificité vis-à-vis de la cardiolipine, en effet, il peut également interagir avec d'autres phospholipides anioniques tels que le phosphatidylglycérol ou le phosphatidylinositol (Lutter et al., 2000; Zha et al., 2000). Les différences d'affinité pourraient en partie s'expliquer par les différentes accessibilités des charges sur les têtes polaires des phospholipides, les charges étant plus exposées dans la cardiolipine et ses précurseurs. D'autre part, les interactions entre les peptides et les membranes s'effectuent en plusieurs étapes au cours desquelles les contributions des différents types d'interaction (électrostatiques, hydrophobes, liaisons hydrogènes) sont variables (Jacobs et White, 1989; White et Wimley, 1999). Si les interactions électrostatiques favorisent l'approche des peptides vers l'interface membranaire, des interactions hydrophobes peuvent augmenter l'affinité de l'interaction et induire l'insertion des peptides dans la membrane dans un deuxième temps. Comme l'indique les expériences d'extinction de fluorescence à l'acrylamide, les tryptophanes du peptide MG 31-53 pourraient participer à l'interaction par des contributions hydrophobes en étant insérés dans la membrane lipidique (figure 31). Ce paramètre, influencé par la nature des chaînes d'acides gras portées par chaque phospholipide, pourrait également expliquer les différentes affinités enregistrées selon le type de phospholipide anionique employé (Ladokhin et White, 2001). Enfin, l'insertion de protéines ou de peptides dans les membranes est influencée par les effets des phospholipides sur la courbure membranaire. Par exemple, Bax s'insère dans des membranes présentant une courbure positive, et y forme des pores alors que cette activité est défavorisée par des membranes contenant des phospholipides favorables aux courbures négatives (Basanez et al., 2002). Puisque le peptide MG 31-53 interagit avec l'affinité la plus importante pour la cardiolipine, il est probable que les courbures négatives favorisent l'insertion du peptide.

I.2. La cardiolipine participe t'elle à l'adressage mitochondrial de la mitogaligine

in vivo?

Il est important de remarquer que d'après les propriétés d'interaction des peptides dérivés de la mitogaligine, la protéine pourrait être adressée à toutes les membranes contenant des phospholipides anioniques dans les cellules. La mitogaligine pourrait par exemple être localisée à la membrane plasmique qui contient du phosphatidylinositol ou du phosphatidylglycérol. La membrane mitochondriale présente cependant des propriétés physiques qui pourraient favoriser l'adressage de la mitogaligine. En effet, la cardiolipine est concentrée dans des micro-domaines membranaires au niveau des sites de contact entre la membrane externe et la membrane interne des mitochondries (Ardail et al., 1990; de Kroon et al., 1997). La densité de charges négatives au niveau de ces sites pourrait, en générant une interface très électrostatique, largement influencer l'adressage de la protéine en raison de son caractère cationique.

Afin de tester l'implication de la cardiolipine dans l'adressage subcellulaire de la mitogaligine, sa localisation a été déterminée dans des levures déficientes en cardiolipine ou en cardiolipine et en phosphatidylglycérol. Les observations réalisées démontrent que la mitogaligine reste adressée aux mitochondries dans ces mutants, ce qui suggère que l'absence de cardiolipine n'affecte pas l'adressage de la mitogaligine dans ces modèles cellulaires (figure 36). Il a cependant été démontré qu'un dysfonctionnement dans la voie de synthèse de la cardiolipine pouvait être compensé par l'accumulation du phospholipide précurseur en amont de l'étape de synthèse déficiente (Chang et al., 1998; Chang et al., 1998; Kikuchi et al., 2000; Ohtsuka et al., 1993). Ainsi, la déficience en cardiolipine résulte en une augmentation du contenu en phosphatidylglycérol dans les mitochondries, et une déficience en phosphatidylglycérol est compensée par l'accumulation de CDP-DAG. Les précurseurs de la cardiolipine synthétisés dans les membranes mitochondriales, pourraient par conséquent permettre l'adressage de la mitogaligine à la mitochondrie en absence de cardiolipine ou de phosphatidylglycérol. En effet, comme le démontrent les résultats obtenus *in vitro*, le peptide MG 31-53 présente une affinité importante pour ces précurseurs. Les compensations entre les phospholipides anioniques compliquent par conséquent l'interprétation des résultats. Certains systèmes semblent cependant permettre de clairement discriminer l'intervention de la cardiolipine dans l'adressage des protéines. En effet, tBid n'est plus adressé aux la mitochondrie dans un modèle murin déficient en cardiolipine (Lutter et al., 2000).

Bien que les résultats obtenus ne permettent pas de conclure définitivement sur l'intervention de la cardiolipine dans l'adressage mitochondrial de la mitogaligine, ils

démontrent que l'interaction entre la mitogaligine avec ce phospholipide est possible, ce qui pourrait contribuer à son adressage mitochondrial. Une étude focalisée sur l'intervention des systèmes protéiques d'imports mitochondriaux devra être réalisée afin de compléter ces résultats, et de discriminer le système d'adressage employé par la mitogaligine. Les peptides et les protéines basiques présentent en effet des affinités importantes pour des pores impliqués dans l'import de protéines mitochondriales (Juin et al., 1995; Vallette et al., 1994). Cette hypothèse ne peut être exclue en considération des résultats obtenus dans cette étude.

I.3. Déstabilisation de membranes phospholipidiques contenant de la cardiolipine par les peptides dérivés de la mitogaligine

Les protéines pro-apoptotiques, Bax et tBid ont *in vitro*, les capacités d'interagir avec des membranes lipidiques et d'induire leur perméabilisation (Zamzami et Kroemer, 2001). Bax peut former des pores par oligomérisation, alors que tBid peut induire un changement de la structure des membranes en interagissant avec des phospholipides impliqués dans la transition de phase $L\alpha$ - HII. Il est important de noter que l'induction de cette transition de phase par tBid pourrait être impliquée dans le relargage de cytochrome c (Erand et al., 2002). Bien qu'il n'existe aucune homologie évidente entre la mitogaligine et les protéines de la famille Bcl-2, son hydrophobicité et son caractère cationique rappellent la composition des peptides antimicrobiens, capables d'interagir avec des membranes et de les perméabiliser. Cette homologie est supportée par ailleurs par les capacités de déstabilisation membranaires des peptides dérivés de la mitogaligine. Ils sont en effet tous capables d'interagir avec des liposomes constitués de cardiolipine, et d'induire leur perméabilisation. A nouveau, le peptide central MG 31-53 présente l'activité la plus importante (figure 33). La déstabilisation des liposomes contenant de la cardiolipine s'accompagne dans ce cas de leur agrégation (figure 34). Cette observation pourrait fournir une indication sur le mécanisme de perméabilisation employé par ce peptide. En effet, l'interaction de certains éléments tels que les cations divalents (calcium, magnésium), ou des protéines avec les têtes polaires de la cardiolipine, modifie la forme de ce phospholipide et induit les transitions de phase $L\alpha$ -HII dans les membranes. Ces changements de phase des membranes induisent leur perméabilisation, et s'accompagnent de phénomènes de fusion et d'agrégation membranaires (Melikyan et Chernomordik, 1997; Ortiz et al., 1999; Tarahovsky et al., 2000). L'agrégation des liposomes contenant de la cardiolipine ou de mitochondries isolées sous l'effet de l'interaction du peptide MG 31-53 (figure 35) indique que, plutôt que d'être inséré dans les membranes et de former des pores à l'image de Bax, la mitogaligine pourrait comme tBid atteindre la

perméabilité de la membrane mitochondriale en modifiant sa courbure en interagissant avec la cardiolipine. Il faut noter que l'expression de la mitogaligine s'accompagne d'une agrégation des mitochondries dans des cellules transfectées (figure 43, 49 et 50). Compte tenu de ces observations, il est tentant de penser que cette altération du réseau mitochondrial, fréquemment observée au cours des processus apoptotiques (Karbowski et Youle, 2003; Youle et Karbowski, 2005), dépende de l'interaction de la mitogaligine avec la cardiolipine dans le cadre de cette étude. D'autre part, les peptides dérivés de la mitogaligine capables d'agréger les mitochondries (figure 35), induisent également la fuite de cytochrome c à partir de mitochondries isolées (Duneau et al., 2005), ce qui suggère que ces événements puissent être liés à leur interaction avec la cardiolipine.

II. La mitogaligine induit-elle une apoptose d'origine nucléaire ou une apoptose initiée à partir des mitochondries?

II.1. Une forme nucléaire de la mitogaligine

Les expériences réalisées dans le cadre de cette étude ont permis de faire la découverte d'une forme nucléaire de la mitogaligine. Alors que la fusion MG-GFP est localisée à la mitochondrie, nous montrons qu'une protéine de fusion constituée de la GFP placée à l'extrémité N-terminale de la mitogaligine est principalement localisée dans le noyau des cellules (figure 38). Cependant, il est important de remarquer que de faibles quantités de la protéine sont adressées aux mitochondries. Ces résultats indiquent que la localisation subcellulaire de mitogaligine est influencée par la position de la GFP dans les protéines de fusion. Bien que la séquence d'adressage nucléaire de la protéine ne soit pas clairement définie, les études actuellement en cours au laboratoire révèlent l'existence d'un signal d'adressage nucléaire complexe, constitué de plusieurs parties dans la mitogaligine. De plus, la GFP ne comporte pas de séquence d'adressage nucléaire, et la localisation nucléaire de la mitogaligine est également observable dans une fusion DsRed-MG-GFP (figure 40), ce qui confirme que les éléments déterminants de l'adressage nucléaire sont portés par la mitogaligine.

L'adressage de la mitogaligine vers le noyau met probablement en jeu des mécanismes de transport actif puisque la protéine est concentrée dans le noyau, et en ressort lorsque la synthèse d'ATP est inhibée (figure 41). Alternativement, ce résultat pourrait indiquer que la rétention de la mitogaligine dans le noyau nécessite de l'ATP. L'interaction ATP dépendante de la mitogaligine avec des protéines nucléaires ou l'ADN pouvant être à l'origine de

l'accumulation de la protéine dans le noyau. Dans cette hypothèse, un changement de conformation ATP dépendant de la mitogaligine pourrait permettre à la région couverte par le peptide MG 31-53 d'interagir avec l'ADN (figure 42).

Il est intéressant de remarquer que l'adressage des protéines mitochondriales est généralement affecté lorsqu'elles sont fusionnées aux protéines fluorescentes, comme le révèlent les résultats issus du **GFP-cDNA Localisation Project** (<http://gfp-cdna.embl.de/>) réalisé à l'EMBL (European Molecular Biology Laboratory). Le test systématique de la localisation de protéines de fusion impliquant la GFP ou ses variants en N- ou C-terminal de protéines d'intérêt, indique que 20 % des protéines mitochondriales testées sont délocalisées lorsque le variant YFP de la GFP est fusionné à leur extrémité C-terminale. L'effet est plus drastique encore lorsque le variant CFP est placé à leur extrémité N-terminale de ces mêmes protéines, puisque 80% des protéines de fusion ne sont plus adressées aux mitochondries. Plus curieusement, 5 des protéines testées, parmi lesquelles, la protéine ribosomale 39S L18 (Swissprot ID: Q9H0U6), sont encore adressées aux mitochondries lorsque les fusions sont réalisées à leur extrémité C-terminale, mais sont strictement localisées dans le noyau des cellules lorsque la protéine fluorescente est située à leur extrémité N-terminale, ce qui démontre que le cas de la mitogaligine n'est pas une exception.

De nombreuses protéines présentent la capacité d'être adressées à deux compartiments cellulaires différents et font intervenir plusieurs mécanismes de régulation de leur adressage (Karniely et Pines, 2005). L'adressage préférentiel d'une protéine vers un compartiment peut notamment être déterminé par la différence d'affinité de la protéine vis-à-vis des systèmes de transport, ou encore par l'accessibilité des signaux d'adressages à ces systèmes. Des changements de conformation des protéines et/ou des modifications post-traductionnelles peuvent influencer cette régulation. Dans cette hypothèse, la présence de la GFP à l'extrémité N- ou C-terminale de la mitogaligine pourrait être impliquée dans un changement de conformation masquant le signal d'adressage mitochondrial et/ou démasquant le signal d'adressage nucléaire.

II.2. Deux cibles et une protéine cytotoxique

Afin de quantifier la mortalité des cellules produisant la mitogaligine, une approche par microscopie de fluorescence sur des cellules transfectées a été adoptée (figure 38). Bien qu'il s'agisse d'une approche classique, la protéine de fusion MG-GFP s'est révélée inutilisable à l'étude de la cytotoxicité de la mitogaligine en raison de son instabilité (figure 39). En effet, cette protéine est au moins partiellement dégradée après son adressage à la

mitochondrie. Cette instabilité est probablement accrue par la présence de la GFP, puisque la mitogaligine n'est pas détectable par immunofluorescence dans cette fusion, alors que la forme native est marquée dans des cellules HeLa transfectées (figure 43). Il est intéressant de noter que seule la mitogaligine est dégradée dans la protéine de fusion MG-GFP, ce qui suggère que la fusion soit clivée après son arrivée à la mitochondrie. L'excédent de taille de la fusion MG-GFP (47 kDa au lieu de 38 kDa) détecté lorsque l'inhibiteur du protéasome est employé (figure 39), pourrait notamment relever d'une mono-ubiquitylation ou de la sumoylation de la protéine sur la lysine en position 65 de la mitogaligine. Ces modifications modulent l'activité des protéines en influençant notamment leur adressage, et ne sont pas associées à la dégradation par le protéasome (Li et al., 2003; Salinas et al., 2004; Wasiak et al., 2007). D'autre part, il serait intéressant de savoir si la mitogaligine peut également être poly-ubiquitylée et adressée vers le protéasome. Par analogie avec l'isoforme courte de P19ARF (smARF), l'action pro-apoptotique de la mitogaligine pourrait ainsi dépendre de la modulation de sa demi-vie par son ubiquitylation (Codogno, 2006; Reef et Kimchi, 2006).

Une protéine de fusion plus stable est obtenue lorsque la GFP est placée à l'extrémité N-terminale de la mitogaligine. Une partie de la protéine de fusion GFP-MG est en effet détectée à la bonne taille en absence de MG132 (figure 39). En revanche, cette protéine de fusion est principalement localisée dans le noyau des cellules, et de faibles quantités sont alors adressées aux mitochondries. De plus, sa production dans des cellules transfectées est hautement cytotoxique (figure 38), et induit une apoptose dépendante des caspases (figure 44). La toxicité de la mitogaligine est en effet réduite en présence de zVAD-fmk, mais on note qu'il s'agit là d'un ralentissement de la mort cellulaire plutôt que d'une inhibition totale (figure 44). Les cellules présentent effectivement, 24 heures après transfection, une morphologie intermédiaire située entre la forme totalement étalée des cellules adhérentes vivantes, et la forme condensée des cellules mortes. Les cellules s'arrondissent progressivement par la suite. L'effet du zVAD-fmk « paraît » en conséquence plus faible 48 heures après transfection. Cependant, les caspases sont encore correctement inhibées après ce temps d'incubation (figure 48). Cette dégénération des cellules exprimant la fusion GFP-MG s'effectue donc malgré l'inhibition des caspases, ce qui suggère que d'autres processus de mort cellulaire pourraient être induits par la mitogaligine. Certains facteurs libérés par les mitochondries, tels que l'AIF ou EndoG, pourraient notamment poursuivre le processus de mort cellulaire indépendamment des caspases (Li et al., 2001). Il est également envisageable que la mitogaligine stimule parallèlement à l'apoptose une voie spécifique de l'autophagie, ou que l'autophagie ou la nécrose soient stimulées par le dysfonctionnement des mitochondries à

la suite de l'altération de leur perméabilité. Cette prise de relais du processus cytotoxique par l'autophagie ou la nécrose reste encore à être déterminée.

Dans le cas de la protéine GFP-MG, la détermination de l'origine de cette cytotoxicité est compliquée par sa double localisation. En effet, l'adressage principalement nucléaire de cette fusion pourrait laisser penser qu'elle génère un stress inducteur de l'apoptose dans le noyau. Cependant, les faibles quantités de la protéine de fusion GFP-MG adressées aux mitochondries pourraient suffire à induire la fuite du cytochrome c, compte tenu de l'action des peptides dérivés de la mitogaligine sur les membranes et les mitochondries (figures 33, 34, et 35). La succession des événements biochimiques qui accompagnent l'apoptose induite par la mitogaligine suggère que cette hypothèse est à prendre en compte.

a) Des événements nucléaires

La fusion GFP-MG étant principalement localisée dans le noyau des cellules, l'hypothèse d'un mode d'action lié à l'activité de la protéine dans ce compartiment a été envisagée. La dégradation de l'ADN observée au cours de l'apoptose induite par la mitogaligine est réalisée en aval de l'activation des caspases (figures 45 et 46); ce qui exclu l'implication directe de la mitogaligine dans la génération des coupures à l'ADN détectées par TUNEL. On constate cependant que la chromatine des cellules exprimant GFP-MG présente une légère condensation en présence de zVAD-fmk (figure 45). L'AIF est impliqué dans un phénomène similaire de condensation de la chromatine indépendant de l'activation des caspases et pourrait être à l'origine de ces observations dans les cellules exprimant GFP-MG. En effet, bien que l'AIF ne possède pas d'activité nucléasique, il est hautement cationique, interagit de façon non spécifique avec de l'ADN et d'induit sa condensation *in vitro* et dans les cellules (Susin et al., 2000; Vahsen et al., 2006). Il faut remarquer que le peptide MG-31-53 peut également induire l'agrégation d'ADN *in vitro* (figure 42). Par conséquent, la mitogaligine pourrait exercer un effet similaire à celui d'AIF sur la chromatine et être responsable d'un stress génotoxique.

Si la mitogaligine induit une altération de l'ADN, de quelle façon le signal est-il transduit? L'inhibition de la caspase 2 ne modifie ni la cinétique, ni le taux de mortalité des cellules exprimant GFP-MG (figure 47) ce qui suggère que le PIDDosome n'est pas impliqué dans l'apoptose induite par la mitogaligine. Toutefois, la signalisation des dommages à l'ADN peut être réalisée par de multiples voies, ce qui ne permet pas d'exclure que la mitogaligine induise une altération de la chromatine spécifiquement détectée par d'autres systèmes. L'implication des protéines de la famille p53 dans l'apoptose induite par la

mitogaligine est notamment en cours d'étude au laboratoire. D'autre part, la transmission de signaux pro-apoptotiques depuis le noyau vers les mitochondries peut également mettre en jeu la régulation de l'expression génique. Cette possibilité est également envisagée.

b) Des évènements mitochondriaux

Quelque soit leur origine, les signaux pro-apoptotiques finissent fréquemment par converger vers les mitochondries au cours de l'apoptose. Dans les cellules exprimant GFP-MG, ou la forme native de la mitogaligine, il est remarquable qu'une altération du réseau mitochondrial est observable alors que la morphologie générale des cellules est normale, que leur chromatine est intègre, et que les mitochondries sont fonctionnelles, et renferment encore le cytochrome c (figures 38, 43, 49, et 50). Les mitochondries apparaissent en effet ponctiformes ou agrégées autour du noyau, alors qu'elles présentent un aspect tubulaire dans les cellules non transfectées. Au cours de l'apoptose, l'aspect du réseau mitochondrial est précocement modifié par l'activation de mécanismes de fission et de fusion des mitochondries dans certains modèles cellulaires. Bien que de nombreuses protéines à l'origine de ces phénomènes soient identifiées, il doit être souligné que d'après les résultats obtenus dans la première partie de cette étude, les peptides dérivés de la mitogaligine peuvent induire l'agrégation de liposomes contenant de la cardiolipine ainsi que de mitochondries isolées (figures 34, et 35). Il est par conséquent tentant de penser que les faibles quantités de la mitogaligine adressées aux mitochondries dans les cellules exprimant GFP-MG, puissent être directement impliquées dans l'altération du réseau mitochondrial au cours de l'apoptose induite par la mitogaligine.

Certaines protéines impliquées dans la fission des mitochondries favorisent l'activité de Bax, ce qui peut s'expliquer par la sensibilité de l'activité perméabilisatrice de Bax vis-à-vis de la courbure des membranes. De façon analogue, la déstructuration des membranes mitochondriales par tBid, ou Bim pourrait favoriser l'action de Bax sur les mitochondries (Gonzalvez et al., 2005; Hsu et Youle, 1997; Yamaguchi et Wang, 2002). Il serait par conséquent intéressant de savoir si la déstabilisation de la membrane mitochondriale par la mitogaligine peut favoriser l'activité de Bax au niveau des mitochondries au cours de l'apoptose (figure 51). Bien qu'il ne puisse être exclu que ce Bax ait été redirigé depuis le cytosol vers les mitochondries par la transduction de signaux provenant du noyau des cellules, il doit être noté que dans les cellules HeLa tout comme dans d'autres types cellulaires, une partie du Bax cellulaire est localisé de façon constitutive au niveau des mitochondries, où il est séquestrée par Bcl-2 ou Bcl-XL (Desagher et al., 1999; Goping et al., 1998). Il est possible

que le Bax détecté dans cette étude corresponde à la forme de la protéine constitutivement adressée aux mitochondries, activée à la suite de la déstructuration du réseau mitochondrial par la mitogaligine.

Malgré l'altération du réseau mitochondrial et la présence de Bax activé dans les mitochondries, le cytochrome c n'est pas libéré dans le cytoplasme dans les cellules étalées exprimant GFP-MG, et le potentiel transmembranaire mitochondrial est conservé. A un stade plus avancé du processus de mort cellulaire, les cellules sont extrêmement condensées, et il est difficile de savoir si le cytochrome c est libre dans le cytoplasme ou encore séquestré dans les mitochondries (figure 49). Certaines études démontrent que le relargage du cytochrome c peut être massif et brutal en fonctionnant selon un principe de « tout-ou-rien » (Goldstein et al., 2000; Martinou et al., 2000; von Ahsen et al., 2000). D'autre part, plusieurs résultats expérimentaux suggèrent que les caspases sont impliquées dans des boucles d'auto-amplification de leur activité. Si l'activation des caspases est favorisée par la déstabilisation des mitochondries et la fuite de cytochrome c, les caspases activées stimulent en retour la perméabilisation des mitochondries en activant Bax, et en convertissant l'activité anti-apoptotique de Bcl-2 et de Bcl-XL en activité pro-apoptotique (Cheng et al., 1997; Goping et al., 1998). Dans ce cas, la fuite du cytochrome c vers le cytoplasme pourrait s'accompagner d'une activation brutale des caspases à l'origine du démantèlement rapide des cellules. Ce mode de fonctionnement pourrait expliquer que les stades morphologiques et biochimiques intermédiaires au cours de l'exécution de la mort cellulaire par apoptose induite par la mitogaligine soient difficilement détectables.

L'inhibiteur général des caspase, le zVAD-fmk, en ralentissant le processus de mort cellulaire induit par la mitogaligine, permet cependant d'observer des états morphologiques intermédiaires pour lesquels le cytochrome c est présent dans le cytoplasme (figure 49), alors que le potentiel transmembranaire mitochondrial est conservé (figure 50). Par conséquent, le cytochrome c est libéré des mitochondries au cours de l'apoptose induite par la mitogaligine en amont de l'activation des caspases, et de l'altération de l'activité bioénergétique des cellules. Puisque Bax est activé, il est probable que la fuite du cytochrome c lui soit attribuable. La détection de Bax au niveau des mitochondries est réalisée à la fois en présence et en absence de zVAD-fmk, ce qui suggère que l'activation de Bax s'effectue en amont de l'exécution de la mort cellulaire par les caspases. Son accumulation pourrait progressivement s'effectuer jusqu'à atteindre un seuil au-delà duquel la fuite de cytochrome c serait rapide et totale (Wang et al., 2003). Toutefois, les cellules exprimant GFP-MG adressent aux

mitochondries de faibles quantités de la mitogaligine qui pourraient contribuer à la perméabilisation des mitochondries en interagissant avec la cardiolipine.

Il est encore difficile de déterminer l'origine subcellulaire de l'apoptose induite par la mitogaligine dans la protéine de fusion GFP-MG. D'une part, de nombreux évènements mitochondriaux sont observables précocement, alors que le noyau est altéré tardivement. De plus, en raison de son activité sur les membranes, la mitogaligine pourrait directement contribuer à l'induction d'une apoptose d'origine mitochondriale en altérant les membranes des mitochondries. Cependant, la protéine de fusion GFP-MG est principalement adressée au noyau des cellules, et bien qu'elle ne semble pas altérer la chromatine, il est possible que la mitogaligine induise une apoptose d'origine nucléaire par d'autres moyens. Ses effets sur l'expression génique devront notamment être déterminés.

III. Une régulation de l'activité cytotoxique de la mitogaligine par son adressage

Les résultats présentés dans cette étude suggèrent que la mitogaligine puisse être adressée au noyau et/ou aux mitochondries, mais il n'est pas encore déterminé si l'adressage de la protéine est dépendant du type cellulaire, et si le transport d'un compartiment vers l'autre est possible. Un certain nombre d'exemples démontrent qu'il existe au cours de l'apoptose un dialogue entre le noyau et les mitochondries. AIF (Daugas et al., 2000; Susin et al., 1999), EndoG (Li et al., 2001), p53 (Mihara et al., 2003; Moll et al., 2006), Nur77 (Li et al., 2000; Moll et al., 2006), l'histone H1.2 (Konishi et al., 2003) ou encore PAK5 (Cotteret et Chernoff, 2006; Wu et Frost, 2006), passent en effet d'un compartiment à l'autre afin de réguler la mort cellulaire ou de participer à son exécution.

La régulation de la translocation des protéines pro-apoptotiques entre le noyau et les mitochondries met en jeu un ensemble de modifications post-traductionnelles issues de différentes voies de signalisation, ce qui accorde à ces protéines un rôle dans l'intégration des signaux cellulaires. Cette complexité s'illustre à travers Nur77. Cette protéine est un récepteur nucléaire orphelin, qui joue un rôle dans la survie lorsqu'il est localisé dans le noyau mais, induit la mort cellulaire par apoptose lorsqu'il est adressé aux mitochondries, en convertissant l'activité anti-apoptotique de Bcl-2 en activité pro-apoptotique (Lin et al., 2004). L'adressage de Nur77 est régulé par des modifications post-traductionnelles ainsi que par son association avec le récepteur X aux rétinoïdes. De façon simplifiée, alors que JNK induit la translocation de Nur77 vers les mitochondries, la phosphorylation de Nur77 par Akt favorise sa rétention

dans le noyau (Han et al., 2006). La mitogaligine présente plusieurs sites potentiels de phosphorylation qui pourraient être impliqués dans la modulation de son adressage. Comme nous l'avons démontré, les interactions de la mitogaligine avec la cardiolipine sont fortement dépendantes de contributions électrostatiques et pourraient par conséquent être affectées par des phosphorylations. En accord avec cette hypothèse, la séquence d'adressage mitochondrial présente de nombreux sites potentiels de phosphorylation, et les peptides mutants phosphomimétiques de cette séquence, MG 35-53 S/E et MG 35-53 TS/EE, interagissent moins efficacement avec les liposomes contenant de la cardiolipine ou avec des mitochondries isolées. D'autre part, bien que la région 31-53 de la mitogaligine ne permette pas à elle seule l'adressage nucléaire, elle pourrait permettre à la protéine d'interagir avec la chromatine. A nouveau, cette capacité pourrait être affectée par la présence de phosphorylations sur cette partie de la mitogaligine, et favoriser son export nucléaire. Par analogie, l'inhibition de l'interaction entre Nur77 et la chromatine par la délétion de son domaine de liaison à l'ADN favorise sa translocation vers les mitochondries.

L'adressage nucléaire de Nur77 est également favorisé par son interaction avec le récepteur X aux rétinoïdes (RXR) (Cao et al., 2004). La phosphorylation de RxR permet notamment à l'hétérodimère Nur77-RXR d'interagir avec l'exportine 1 / CRM1 et d'être transporté hors du noyau. Cette étude démontre que l'adressage de la mitogaligine au noyau requiert de l'ATP, ce qui suggère que son interaction avec des protéines nucléaires, ou avec l'ADN soit ATP dépendante, ou que la mitogaligine emprunte les systèmes actifs d'import nucléaire. Il est possible que l'adressage nucléaire de la mitogaligine soit plus indirectement lié à son interaction avec des partenaires spécifiques de ce compartiment. La modulation leurs interactions pourrait ainsi constituer un mode de régulation de l'adressage de la mitogaligine. Enfin, p53 induit, sous l'effet de dommages sévères à l'ADN, une réponse apoptotique en partie dépendante de sa translocation depuis le noyau vers les mitochondries (Essmann et al., 2005; Mihara et al., 2003). L'adressage de p53 est modulé par des modifications post-traductionnelles qui impliquent notamment l'ubiquitine ligase, mdm2. Dans ce système, mdm2 polyubiquitine et favorise la dégradation de p53 par le protéasome dans des conditions normales de vie ou lorsque les cellules sont atteintes par des stress génotoxiques mineurs. En revanche, des dommages importants à l'ADN favorisent la réduction de l'activité de mdm2 qui ne réalise alors qu'une mono-ubiquitylation de p53. Cette modification post-traductionnelle simple induit alors la translocation de p53 vers les mitochondries (Li et al., 2003; Marchenko et al., 2007). Les résultats préliminaires obtenus dans cette étude suggèrent que les protéines de fusion GFP-MG et MG-GFP sont stabilisées en présence de MG132, un

inhibiteur du protéasome. Ces observations suggèrent que l'ubiquitylation de la mitogaligine puisse être impliquée dans sa dégradation, mais est-ce son seul rôle?

Si l'activité cytotoxique de la mitogaligine est modulée par son adressage à la façon de ces protéines pro-apoptotiques, la mitogaligine est-elle une protéine pro-apoptotique mitochondriale relarguée au cours de l'apoptose vers le cytoplasme puis adressée au noyau ou une protéine nucléaire relocalisée vers les mitochondries pour induire l'apoptose ? Les résultats obtenus avec les cellules HeLa indiquent que la forme native de la mitogaligine est adressée aux mitochondries cependant, la détermination de la localisation de la mitogaligine devra être effectuée dans les cellules exprimant naturellement la mitogaligine et l'étude de son activité devra être effectuée dans des modèles cellulaires correspondant. D'autre part, si la mitogaligine peut être adressée à deux compartiments différents, la protéine peut-elle exercer une fonction autre que sa fonction pro-apoptotique dans l'un d'eux ? Les réponses à ces questions devront être trouvées afin de définir la place de la mitogaligine dans le fonctionnement physiologique des cellules.

Bibliographie

- Abrams, J. M. (2002). Competition and compensation: coupled to death in development and cancer. *Cell*. *110*, 403-6.
- Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D. G., Heuser, J. E., Wang, X., and Akey, C. W. (2002). Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell*. *9*, 423-32.
- Adams, J. M. (2003). Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev*. *17*, 2481-95.
- Adams, J. M., and Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* *281*, 1322-6.
- Adams, J. M., and Cory, S. (2001). Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci*. *26*, 61-6.
- Adrain, C., Creagh, E. M., and Martin, S. J. (2001). Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. *Embo J*. *20*, 6627-36.
- Amati, B., Littlewood, T. D., Evan, G. I., and Land, H. (1993). The c-Myc protein induces cell cycle progression and apoptosis through dimerization with Max. *Embo J*. *12*, 5083-7.
- Ameisen, J. C. (2002). On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death Differ*. *9*, 367-93.
- Ameisen, J. C., Estaquier, J., Idziorek, T., and De Bels, F. (1995). The relevance of apoptosis to AIDS pathogenesis. *Trends Cell Biol* *5*, 27-32.
- Ameisen, J. C., Idziorek, T., Billaut-Mulot, O., Loyens, M., Tissier, J. P., Potentier, A., and Ouaiissi, A. (1995). 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. *Cell Death Differ*. *2*, 285-300.
- Amundson, S. A., Myers, T. G., Scudiero, D., Kitada, S., Reed, J. C., and Fornace, A. J., Jr. (2000). An informatics approach identifying markers of chemosensitivity in human cancer cell lines. *Cancer Res*. *60*, 6101-10.
- Antonsson, B., Montessuit, S., Lauper, S., Eskes, R., and Martinou, J. C. (2000). Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J* *345*, 271-8.
- Ardail, D., Privat, J. P., Egret-Charlier, M., Levrat, C., Lerme, F., and Louisot, P. (1990). Mitochondrial contact sites. Lipid composition and dynamics. *J Biol Chem*. *265*, 18797-802.
- Arico, S., Petiot, A., Bauvy, C., Dubbelhuis, P. F., Meijer, A. J., Codogno, P., and Ogier-Denis, E. (2001). The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J Biol Chem*. *276*, 35243-6. Epub 2001 Jul 26.
- Arnoult, D., Akarid, K., Grodet, A., Petit, P. X., Estaquier, J., and 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., and Youle, R. J. (2003). Caspase inhibition prevents the mitochondrial release of apoptosis-inducing factor. *Cell Death Differ* *10*, 845-9.
- Bacon, A. L., and Harris, A. L. (2004). Hypoxia-inducible factors and hypoxic cell death in tumour physiology. *Ann Med*. *36*, 530-9.

- Balkwill, F., Charles, K. A., and Mantovani, A. (2005). Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell*. 7, 211-7.
- Balmain, A. (2001). Cancer genetics: from Boveri and Mendel to microarrays. *Nat Rev Cancer*. 1, 77-82.
- Bartkova, J., Horejsi, Z., Koed, K., Kramer, A., Tort, F., Zieger, K., Guldberg, P., Sehested, M., Nesland, J. M., Lukas, C., Orntoft, T., Lukas, J., and Bartek, J. (2005). DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature*. 434, 864-70.
- Basanez, G., Sharpe, J. C., Galanis, J., Brandt, T. B., Hardwick, J. M., and Zimmerberg, J. (2002). Bax-type apoptotic proteins porate pure lipid bilayers through a mechanism sensitive to intrinsic monolayer curvature. *J Biol Chem*. 277, 49360-5. Epub 2002 Oct 14.
- Basanez, G., Sharpe, J. C., Galanis, J., Brandt, T. B., Hardwick, J. M., and Zimmerberg, J. (2002). Bax-type apoptotic proteins porate pure lipid bilayers through a mechanism sensitive to intrinsic monolayer curvature. *J Biol Chem* 277, 49360-5. Epub 2002 Oct 14.
- Berezovskaya, O., Schimmer, A. D., Glinskii, A. B., Pinilla, C., Hoffman, R. M., Reed, J. C., and Glinsky, G. V. (2005). Increased expression of apoptosis inhibitor protein XIAP contributes to anoikis resistance of circulating human prostate cancer metastasis precursor cells. *Cancer Res*. 65, 2378-86.
- Berg, C. P., Engels, I. H., Rothbart, A., Lauber, K., Renz, A., Schlosser, S. F., Schulze-Osthoff, K., and Wesselborg, S. (2001). Human mature red blood cells express caspase-3 and caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis. *Cell Death Differ*. 8, 1197-206.
- Bermudez, V. P., Lindsey-Boltz, L. A., Cesare, A. J., Maniwa, Y., Griffith, J. D., Hurwitz, J., and Sancar, A. (2003). Loading of the human 9-1-1 checkpoint complex onto DNA by the checkpoint clamp loader hRad17-replication factor C complex in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100, 1633-8. Epub 2003 Feb 10.
- Berns, A. (2005). Cancer: two in one. *Nature*. 436, 787-9.
- Beschiaschvili, G., and Seelig, J. (1990). Melittin binding to mixed phosphatidylglycerol/phosphatidylcholine membranes. *Biochemistry*. 29, 52-8.
- Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-23.
- Blume-Jensen, P., and Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature*. 411, 355-65.
- Boatright, K. M., Renatus, M., Scott, F. L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I. M., Ricci, J. E., Edris, W. A., Sutherlin, D. P., Green, D. R., and Salvesen, G. S. (2003). A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell*. 11, 529-41.
- Boldin, M. P., Goncharov, T. M., Goltsev, Y. V., and Wallach, D. (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell*. 85, 803-15.
- Bonzon, C., Bouchier-Hayes, L., Pagliari, L. J., Green, D. R., and Newmeyer, D. D. (2006). Caspase-2-induced apoptosis requires bid cleavage: a physiological role for bid in heat shock-induced death. *Mol Biol Cell*. 17, 2150-7. Epub 2006 Feb 22.
- Bouleau, S., Grimal, H., Rincheval, V., Godefroy, N., Mignotte, B., Vayssiere, J. L., and Renaud, F. (2005). FGF1 inhibits p53-dependent apoptosis and cell cycle arrest via an intracrine pathway. *Oncogene*. 24, 7839-49.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B., and Behr, J. P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 92, 7297-301.
- Brady, H. J., Gil-Gomez, G., Kirberg, J., and Berns, A. J. (1996). Bax alpha perturbs T cell development and affects cell cycle entry of T cells. *Embo J*. 15, 6991-7001.

- Bratosin, D., Estaquier, J., Petit, F., Arnoult, D., Quatannens, B., Tissier, J. P., Slomianny, C., Sartiaux, C., Alonso, C., Huart, J. J., Montreuil, J., and Ameisen, J. C. (2001). Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. *Cell Death Differ.* *8*, 1143-56.
- Brenner, C., Cadiou, H., Vieira, H. L., Zamzami, N., Marzo, I., Xie, Z., Leber, B., Andrews, D., Duclouhier, H., Reed, J. C., and Kroemer, G. (2000). Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator. *Oncogene.* *19*, 329-36.
- Brenner, C., and Kroemer, G. (2000). Apoptosis. Mitochondria--the death signal integrators. *Science.* *289*, 1150-1.
- Buckland, A. G., and Wilton, D. C. (2000). Anionic phospholipids, interfacial binding and the regulation of cell functions. *Biochim Biophys Acta.* *1483*, 199-216.
- Cai, J., and Jones, D. P. (1998). Superoxide in apoptosis. Mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss. *J Biol Chem.* *273*, 11401-4.
- Cande, C., Vahsen, N., Kouranti, I., Schmitt, E., Daugas, E., Spahr, C., Luban, J., Kroemer, R. T., Giordanetto, F., Garrido, C., Penninger, J. M., and Kroemer, G. (2004). AIF and cyclophilin A cooperate in apoptosis-associated chromatinolysis. *Oncogene.* *23*, 1514-21.
- Cao, X., Liu, W., Lin, F., Li, H., Kolluri, S. K., Lin, B., Han, Y. H., Dawson, M. I., and Zhang, X. K. (2004). Retinoid X receptor regulates Nur77/TR3-dependent apoptosis [corrected] by modulating its nuclear export and mitochondrial targeting. *Mol Cell Biol.* *24*, 9705-25.
- Cartron, P. F., Oliver, L., Mayat, E., Meflah, K., and Vallette, F. M. (2004). Impact of pH on Bax alpha conformation, oligomerisation and mitochondrial integration. *FEBS Lett* *578*, 41-6.
- Castedo, M., Perfettini, J. L., Roumier, T., Andreau, K., Medema, R., and Kroemer, G. (2004). Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene.* *23*, 2825-37.
- Chambers, A. F., Groom, A. C., and MacDonald, I. C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer.* *2*, 563-72.
- Chang, S. C., Heacock, P. N., Clancey, C. J., and Dowhan, W. (1998). The PEL1 gene (renamed PGS1) encodes the phosphatidylglycero-phosphate synthase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* *273*, 9829-36.
- Chang, S. C., Heacock, P. N., Mileykovskaya, E., Voelker, D. R., and Dowhan, W. (1998). Isolation and characterization of the gene (CLS1) encoding cardiolipin synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* *273*, 14933-41.
- Cheng, E. H., Kirsch, D. G., Clem, R. J., Ravi, R., Kastan, M. B., Bedi, A., Ueno, K., and Hardwick, J. M. (1997). Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* *278*, 1966-8.
- Chiarugi, A., and Moskowitz, M. A. (2002). Cell biology. PARP-1--a perpetrator of apoptotic cell death? *Science.* *297*, 200-1.
- Chin, L., Artandi, S. E., Shen, Q., Tam, A., Lee, S. L., Gottlieb, G. J., Greider, C. W., and DePinho, R. A. (1999). p53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis. *Cell.* *97*, 527-38.
- Chin, L., Tam, A., Pomerantz, J., Wong, M., Holash, J., Bardeesy, N., Shen, Q., O'Hagan, R., Pantginis, J., Zhou, H., Horner, J. W., 2nd, Cordon-Cardo, C., Yancopoulos, G. D., and DePinho, R. A. (1999). Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance. *Nature.* *400*, 468-72.
- Chipuk, J. E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N. M., Newmeyer, D. D., Schuler, M., and Green, D. R. (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science.* *303*, 1010-4.

- Choi, S. Y., Gonzalvez, F., Jenkins, G. M., Slomianny, C., Chretien, D., Arnoult, D., Petit, P. X., and Frohman, M. A. (2007). Cardiolipin deficiency releases cytochrome c from the inner mitochondrial membrane and accelerates stimuli-elicited apoptosis. *Cell Death Differ.* *14*, 597-606. Epub 2006 Aug 4.
- Chou, J. J., Li, H., Salvesen, G. S., Yuan, J., and Wagner, G. (1999). Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signaling. *Cell.* *96*, 615-24.
- Christensen, S. T., Wheatley, D. N., Rasmussen, M. I., and Rasmussen, L. (1995). Mechanisms controlling death, survival and proliferation in a model unicellular eukaryote *Tetrahymena thermophila*. *Cell Death Differ.* *2*, 301-8.
- Cirulli, V., and Yebra, M. (2007). Netrins: beyond the brain. *Nat Rev Mol Cell Biol.* *8*, 296-306. Epub 2007 Mar 14.
- Codogno, P. (2006). Autophagy and caspase-independent cell death: p19ARF enters the game. *Dev Cell.* *10*, 688-9.
- Cohen, G. M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* *326*, 1-16.
- Cory, S., and Adams, J. M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer.* *2*, 647-56.
- Costantini, P., Belzacq, A. S., Vieira, H. L., Larochette, N., de Pablo, M. A., Zamzami, N., Susin, S. A., Brenner, C., and Kroemer, G. (2000). Oxidation of a critical thiol residue of the adenine nucleotide translocator enforces Bcl-2-independent permeability transition pore opening and apoptosis. *Oncogene.* *19*, 307-14.
- Cote, J., and Ruiz-Carrillo, A. (1993). Primers for mitochondrial DNA replication generated by endonuclease G. *Science.* *261*, 765-9.
- Cotteret, S., and Chernoff, J. (2006). Nucleocytoplasmic shuttling of Pak5 regulates its antiapoptotic properties. *Mol Cell Biol.* *26*, 3215-30.
- Counter, C. M., Avilion, A. A., LeFeuvre, C. E., Stewart, N. G., Greider, C. W., Harley, C. B., and Bacchetti, S. (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *Embo J.* *11*, 1921-9.
- Cretney, E., Takeda, K., Yagita, H., Glaccum, M., Peschon, J. J., and Smyth, M. J. (2002). Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. *J Immunol.* *168*, 1356-61.
- Danial, N. N., and Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell.* *116*, 205-19.
- Dansen, T. B., Whitfield, J., Rostker, F., Brown-Swigart, L., and Evan, G. I. (2006). Specific requirement for Bax, not Bak, in Myc-induced apoptosis and tumor suppression in vivo. *J Biol Chem.* *281*, 10890-5. Epub 2006 Feb 7.
- Daugas, E., Nochy, D., Ravagnan, L., Loeffler, M., Susin, S. A., Zamzami, N., and Kroemer, G. (2000). Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Lett.* *476*, 118-23.
- Daugas, E., Susin, S. A., Zamzami, N., Ferri, K. F., Irinopoulou, T., Larochette, N., Prevost, M. C., Leber, B., Andrews, D., Penninger, J., and Kroemer, G. (2000). Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *Faseb J.* *14*, 729-39.
- de Kroon, A. I., Dolis, D., Mayer, A., Lill, R., and de Kruijff, B. (1997). Phospholipid composition of highly purified mitochondrial outer membranes of rat liver and *Neurospora crassa*. Is cardiolipin present in the mitochondrial outer membrane? *Biochim Biophys Acta.* *1325*, 108-16.
- de Kruijff, B. (1994). Anionic phospholipids and protein translocation. *FEBS Lett.* *346*, 78-82.

- Debatin, K. M., Poncet, D., and Kroemer, G. (2002). Chemotherapy: targeting the mitochondrial cell death pathway. *Oncogene*. *21*, 8786-803.
- Degenhardt, K., Chen, G., Lindsten, T., and White, E. (2002). BAX and BAK mediate p53-independent suppression of tumorigenesis. *Cancer Cell*. *2*, 193-203.
- Degenhardt, K., Mathew, R., Beaudoin, B., Bray, K., Anderson, D., Chen, G., Mukherjee, C., Shi, Y., Gelinas, C., Fan, Y., Nelson, D. A., Jin, S., and White, E. (2006). Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell*. *10*, 51-64.
- Demel, R. A., Jordi, W., Lambrechts, H., van Damme, H., Hovius, R., and de Kruijff, B. (1989). Differential interactions of apo- and holocytochrome c with acidic membrane lipids in model systems and the implications for their import into mitochondria. *J Biol Chem*. *264*, 3988-97.
- Denecker, G., Vercammen, D., Declercq, W., and Vandennebeele, P. (2001). Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. *Cell Mol Life Sci*. *58*, 356-70.
- Dennis, P. A., and Kastan, M. B. (1998). Cellular survival pathways and resistance to cancer therapy. *Drug Resist Updat*. *1*, 301-9.
- Desagher, S., and Martinou, J. C. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* *10*, 369-77.
- Desagher, S., Osen-Sand, A., Montessuit, S., Magnenat, E., Vilbois, F., Hochmann, A., Journot, L., Antonsson, B., and Martinou, J. C. (2001). Phosphorylation of bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8. *Mol Cell*. *8*, 601-11.
- Desagher, S., Osen-Sand, A., Nichols, A., Eskes, R., Montessuit, S., Lauper, S., Maundrell, K., Antonsson, B., and 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.
- Deveraux, Q. L., Leo, E., Stennicke, H. R., Welsh, K., Salvesen, G. S., and Reed, J. C. (1999). Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *Embo J*. *18*, 5242-51.
- Deveraux, Q. L., Roy, N., Stennicke, H. R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Salvesen, G. S., and Reed, J. C. (1998). IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *Embo J* *17*, 2215-23.
- Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S., and Reed, J. C. (1997). X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature*. *388*, 300-4.
- Douma, S., Van Laar, T., Zevenhoven, J., Meuwissen, R., Van Garderen, E., and Peeper, D. S. (2004). Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB. *Nature*. *430*, 1034-9.
- Downward, J. (2004). PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Semin Cell Dev Biol*. *15*, 177-82.
- Dröin, N. M., and Green, D. R. (2004). Role of Bcl-2 family members in immunity and disease. *Biochim Biophys Acta*. *1644*, 179-88.
- Druker, B. J., Sawyers, C. L., Kantarjian, H., Resta, D. J., Reese, S. F., Ford, J. M., Capdeville, R., and Talpaz, M. (2001). Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med*. *344*, 1038-42.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. *102*, 33-42.
- Duke, R. C., and Cohen, J. J. (1986). IL-2 addiction: withdrawal of growth factor activates a suicide program in dependent T cells. *Lymphokine Res*. *5*, 289-99.

- Duneau, M., Boyer-Guittaut, M., Gonzalez, P., Charpentier, S., Normand, T., Dubois, M., Raimond, J., and Legrand, A. (2005). Galig, a novel cell death gene that encodes a mitochondrial protein promoting cytochrome c release. *Exp Cell Res* 302, 194-205.
- Efeyan, A., and Serrano, M. (2007). p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell Cycle* 6, 1006-10. Epub 2007 May 28.
- Eftink, M. R., and Ghiron, C. A. (1976). Exposure of tryptophanyl residues in proteins. Quantitative determination by fluorescence quenching studies. *Biochemistry* 15, 672-80.
- Eischen, C. M., Packham, G., Nip, J., Fee, B. E., Hiebert, S. W., Zambetti, G. P., and Cleveland, J. L. (2001). Bcl-2 is an apoptotic target suppressed by both c-Myc and E2F-1. *Oncogene* 20, 6983-93.
- Elkon, K. B. (1999). Caspases. Multifunctional proteases. *J Exp Med* 190, 1725-8.
- Ellis, H. M., and Horvitz, H. R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44, 817-29.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50.
- Enoksson, M., Robertson, J. D., Gogvadze, V., Bu, P., Kropotov, A., Zhivotovsky, B., and Orrenius, S. (2004). Caspase-2 permeabilizes the outer mitochondrial membrane and disrupts the binding of cytochrome c to anionic phospholipids. *J Biol Chem* 279, 49575-8. Epub 2004 Oct 8.
- Epanand, R. F., Martinou, J. C., Fornallaz-Mulhauser, M., Hughes, D. W., and Epanand, R. M. (2002). The apoptotic protein tBid promotes leakage by altering membrane curvature. *J Biol Chem* 277, 32632-9.
- Epanand, R. F., Martinou, J. C., Montessuit, S., Epanand, R. M., and Yip, C. M. (2002). Direct evidence for membrane pore formation by the apoptotic protein Bax. *Biochem Biophys Res Commun* 298, 744-9.
- Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B., and Martinou, J. C. (2000). Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* 20, 929-35.
- Essmann, F., Pohlmann, S., Gillissen, B., Daniel, P. T., Schulze-Osthoff, K., and Janicke, R. U. (2005). Irradiation-induced translocation of p53 to mitochondria in the absence of apoptosis. *J Biol Chem* 280, 37169-77. Epub 2005 Sep 7.
- Evan, G. I., Wyllie, A. H., Gilbert, C. S., Littlewood, T. D., Land, H., Brooks, M., Waters, C. M., Penn, L. Z., and Hancock, D. C. (1992). Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 69, 119-28.
- Fearon, E. R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759-67.
- Ferri, K. F., Jacotot, E., Blanco, J., Este, J. A., Zamzami, N., Susin, S. A., Xie, Z., Brothers, G., Reed, J. C., Penninger, J. M., and Kroemer, G. (2000). Apoptosis control in syncytia induced by the HIV type 1-envelope glycoprotein complex: role of mitochondria and caspases. *J Exp Med* 192, 1081-92.
- Fishel, R., Lescoe, M. K., Rao, M. R., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Garber, J., Kane, M., and Kolodner, R. (1993). The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 75, 1027-38.
- Fleury, C., Mignotte, B., and Vayssiere, J. L. (2002). Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie* 84, 131-41.
- Foghsgaard, L., Lademann, U., Wissing, D., Poulsen, B., and Jaattela, M. (2002). Cathepsin B mediates tumor necrosis factor-induced arachidonic acid release in tumor cells. *J Biol Chem* 277, 39499-506. Epub 2002 Aug 15.

- Forcet, C., Ye, X., Granger, L., Corset, V., Shin, H., Bredesen, D. E., and Mehlen, P. (2001). The dependence receptor DCC (deleted in colorectal cancer) defines an alternative mechanism for caspase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. *98*, 3416-21. Epub 2001 Feb 27.
- Freyberg, M. A., Kaiser, D., Graf, R., Vischer, P., and Friedl, P. (2000). Integrin-associated protein and thrombospondin-1 as endothelial mechanosensitive death mediators. *Biochem Biophys Res Commun*. *271*, 584-8.
- Fulda, S., and Debatin, K. M. (2006). Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*. *25*, 4798-811.
- Gao, Z., Shao, Y., and Jiang, X. (2005). Essential roles of the Bcl-2 family of proteins in caspase-2-induced apoptosis. *J Biol Chem*. *280*, 38271-5. Epub 2005 Sep 19.
- Garcia-Saez, A. J., Mingarro, I., Perez-Paya, E., and Salgado, J. (2004). Membrane-insertion fragments of Bcl-xL, Bax, and Bid. *Biochemistry*. *43*, 10930-43.
- Gardai, S. J., Hildeman, D. A., Frankel, S. K., Whitlock, B. B., Frasca, S. C., Borregaard, N., Marrack, P., Bratton, D. L., and Henson, P. M. (2004). Phosphorylation of Bax Ser184 by Akt regulates its activity and apoptosis in neutrophils. *J Biol Chem*. *279*, 21085-95. Epub 2004 Feb 6.
- Georgiou, T., Yu, Y. N., Ekunwe, S., Buttner, M. J., Zuurmond, A., Kraal, B., Kleantous, C., and Snyder, L. (1998). Specific peptide-activated proteolytic cleavage of Escherichia coli elongation factor Tu. *Proc Natl Acad Sci U S A*. *95*, 2891-5.
- Glinsky, G. V., Glinsky, V. V., Ivanova, A. B., and Hueser, C. J. (1997). Apoptosis and metastasis: increased apoptosis resistance of metastatic cancer cells is associated with the profound deficiency of apoptosis execution mechanisms. *Cancer Lett*. *115*, 185-93.
- Glucksmann, A. (1951). Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol Rev Camb Philos Soc* *26*, 59-86.
- Godefroy, N., Lemaire, C., Renaud, F., Rincheval, V., Perez, S., Parvu-Ferecatu, I., Mignotte, B., and Vayssiere, J. L. (2004). p53 can promote mitochondria- and caspase-independent apoptosis. *Cell Death Differ*. *11*, 785-7.
- Goldstein, J. C., Waterhouse, N. J., Juin, P., Evan, G. I., and Green, D. R. (2000). The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol* *2*, 156-62.
- Golstein, P., and Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci*. *32*, 37-43. Epub 2006 Dec 1.
- Gonzalez, V. M., Fuertes, M. A., Alonso, C., and Perez, J. M. (2001). Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol Pharmacol*. *59*, 657-63.
- Gonzalvez, F., and Gottlieb, E. (2007). Cardiolipin: Setting the beat of apoptosis. *Apoptosis*. *12*, 877-85.
- Gonzalvez, F., Pariselli, F., Dupaigne, P., Budihardjo, I., Lutter, M., Antonsson, B., Dirolez, P., Manon, S., Martinou, J. C., Gubern, M., Wang, X., Bernard, S., and Petit, P. X. (2005). tBid interaction with cardiolipin primarily orchestrates mitochondrial dysfunctions and subsequently activates Bax and Bak. *Cell Death Differ*. *12*, 614-26.
- Goossens, V., De Vos, K., Vercaemmen, D., Steemans, M., Vancompernelle, K., Fiers, W., Vandenabeele, P., and Grooten, J. (1999). Redox regulation of TNF signaling. *Biofactors*. *10*, 145-56.
- Goping, I. S., Gross, A., Lavoie, J. N., Nguyen, M., Jemmerson, R., Roth, K., Korsmeyer, S. J., and Shore, G. C. (1998). Regulated targeting of BAX to mitochondria. *J Cell Biol* *143*, 207-15.
- Graeber, T. G., Osmanian, C., Jacks, T., Housman, D. E., Koch, C. J., Lowe, S. W., and Giaccia, A. J. (1996). Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature*. *379*, 88-91.

- Graf, R., Apenberg, S., Freyberg, M., and Friedl, P. (2003). A common mechanism for the mechanosensitive regulation of apoptosis in different cell types and for different mechanical stimuli. *Apoptosis*. 8, 531-8.
- Greaves, M. (2007). Darwinian medicine: a case for cancer. *Nat Rev Cancer*. 7, 213-21. Epub 2007 Feb 15.
- Green, D. R. (2005). Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell*. 121, 671-4.
- Green, D. R., and Reed, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-12.
- Grossman, D., Kim, P. J., Schechner, J. S., and Altieri, D. C. (2001). Inhibition of melanoma tumor growth in vivo by survivin targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98, 635-40. Epub 2001 Jan 9.
- Grossmann, J. (2002). Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis--Anoikis". *Apoptosis*. 7, 247-60.
- Guertin, D. A., and Sabatini, D. M. (2005). An expanding role for mTOR in cancer. *Trends Mol Med*. 11, 353-61.
- Guittaut, M., Charpentier, S., Normand, T., Dubois, M., Raimond, J., and 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, 2652-7.
- Guo, B., Zhai, D., Cabezas, E., Welsh, K., Nouraini, S., Satterthwait, A. C., and Reed, J. C. (2003). Humanin peptide suppresses apoptosis by interfering with Bax activation. *Nature*. 423, 456-61. Epub 2003 May 4.
- Guo, Y., Srinivasula, S. M., Druilhe, A., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E. S. (2002). Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. *J Biol Chem*. 277, 13430-7. Epub 2002 Feb 6.
- Gupta, G. P., and Massague, J. (2006). Cancer metastasis: building a framework. *Cell*. 127, 679-95.
- Gustafsson, A. B., Tsai, J. G., Logue, S. E., Crow, M. T., and Gottlieb, R. A. (2004). Apoptosis repressor with caspase recruitment domain protects against cell death by interfering with Bax activation. *J Biol Chem*. 279, 21233-8. Epub 2004 Mar 5.
- Ha, H. C., and Snyder, S. H. (1999). Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96, 13978-82.
- Haga, M., Chen, A., Gortler, D., Dardik, A., and Sumpio, B. E. (2003). Shear stress and cyclic strain may suppress apoptosis in endothelial cells by different pathways. *Endothelium*. 10, 149-57.
- Halestrap, A. P. (2004). Mitochondrial permeability: dual role for the ADP/ATP translocator? *Nature*. 430, 1 p following 983.
- Han, Y. H., Cao, X., Lin, B., Lin, F., Kolluri, S. K., Stebbins, J., Reed, J. C., Dawson, M. I., and Zhang, X. K. (2006). Regulation of Nur77 nuclear export by c-Jun N-terminal kinase and Akt. *Oncogene*. 25, 2974-86.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*. 100, 57-70.
- Hao, H., Dong, Y., Bowling, M. T., Gomez-Gutierrez, J. G., Zhou, H. S., and McMasters, K. M. (2007). E2F-1 induces melanoma cell apoptosis via PUMA up-regulation and Bax translocation. *BMC Cancer*. 7, 24.
- Hara, E., Tsurui, H., Shinozaki, A., Nakada, S., and Oda, K. (1991). Cooperative effect of antisense-Rb and antisense-p53 oligomers on the extension of life span in human diploid fibroblasts, TIG-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 179, 528-34.
- Harris, H. (2004). Tumour suppression: putting on the brakes. *Nature*. 427, 201.
- Hastie, N. D., Dempster, M., Dunlop, M. G., Thompson, A. M., Green, D. K., and Allshire, R. C. (1990). Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature*. 346, 866-8.

- Hayflick, L., and Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25, 585-621.
- Hengartner, M. (1998). Apoptosis. Death by crowd control. *Science*. 281, 1298-9.
- Hengartner, M. O. (2001). Apoptosis. DNA destroyers. *Nature*. 412, 27, 29.
- Herceg, Z., and Wang, Z. Q. (1999). Failure of poly(ADP-ribose) polymerase cleavage by caspases leads to induction of necrosis and enhanced apoptosis. *Mol Cell Biol*. 19, 5124-33.
- Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J. L., Schneider, P., Seed, B., and Tschopp, J. (2000). Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol*. 1, 489-95.
- Hsu, Y. T., and Youle, R. J. (1997). Nonionic detergents induce dimerization among members of the Bcl-2 family. *J Biol Chem*. 272, 13829-34.
- Huez, I., Creancier, L., Audigier, S., Gensac, M. C., Prats, A. C., and Prats, H. (1998). Two independent internal ribosome entry sites are involved in translation initiation of vascular endothelial growth factor mRNA. *Mol Cell Biol*. 18, 6178-90.
- Ichikawa, K., Liu, W., Zhao, L., Wang, Z., Liu, D., Ohtsuka, T., Zhang, H., Mountz, J. D., Koopman, W. J., Kimberly, R. P., and Zhou, T. (2001). Tumoricidal activity of a novel anti-human DR5 monoclonal antibody without hepatocyte cytotoxicity. *Nat Med*. 7, 954-60.
- Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., Noda, T., and Ohsumi, Y. (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*. 408, 488-92.
- Inbal, B., Bialik, S., Sabanay, I., Shani, G., and Kimchi, A. (2002). DAP kinase and DRP-1 mediate membrane blebbing and the formation of autophagic vesicles during programmed cell death. *J Cell Biol*. 157, 455-68. Epub 2002 Apr 29.
- Inbal, B., Cohen, O., Polak-Charcon, S., Kopolovic, J., Vadai, E., Eisenbach, L., and Kimchi, A. (1997). DAP kinase links the control of apoptosis to metastasis. *Nature*. 390, 180-4.
- Jacobs, R. E., and White, S. H. (1989). The nature of the hydrophobic binding of small peptides at the bilayer interface: implications for the insertion of transbilayer helices. *Biochemistry*. 28, 3421-37.
- Jacobson, M. D., Weil, M., and Raff, M. C. (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell* 88, 347-54.
- Jacotot, E., Ferri, K. F., El Hamel, C., Brenner, C., Druillennec, S., Hoebeke, J., Rustin, P., Metivier, D., Lenoir, C., Geuskens, M., Vieira, H. L., Loeffler, M., Belzacq, A. S., Briand, J. P., Zamzami, N., Edelman, L., Xie, Z. H., Reed, J. C., Roques, B. P., and Kroemer, G. (2001). Control of mitochondrial membrane permeabilization by adenine nucleotide translocator interacting with HIV-1 viral protein rR and Bcl-2. *J Exp Med*. 193, 509-19.
- Jakobisiak, M., Lasek, W., and Golab, J. (2003). Natural mechanisms protecting against cancer. *Immunol Lett*. 90, 103-22.
- Janssens, S., Tinel, A., Lippens, S., and Tschopp, J. (2005). PIDD mediates NF-kappaB activation in response to DNA damage. *Cell*. 123, 1079-92.
- Janumyan, Y. M., Sansam, C. G., Chattopadhyay, A., Cheng, N., Soucie, E. L., Penn, L. Z., Andrews, D., Knudson, C. M., and Yang, E. (2003). Bcl-xL/Bcl-2 coordinately regulates apoptosis, cell cycle arrest and cell cycle entry. *Embo J*. 22, 5459-70.
- Jensen, R. B., and Gerdes, K. (1995). Programmed cell death in bacteria: proteic plasmid stabilization systems. *Mol Microbiol*. 17, 205-10.

- Jiang, F., Ryan, M. T., Schlame, M., Zhao, M., Gu, Z., Klingenberg, M., Pfanner, N., and Greenberg, M. L. (2000). Absence of cardiolipin in the *crd1* null mutant results in decreased mitochondrial membrane potential and reduced mitochondrial function. *J Biol Chem.* *275*, 22387-94.
- Jin, S., DiPaola, R. S., Mathew, R., and White, E. (2007). Metabolic catastrophe as a means to cancer cell death. *J Cell Sci.* *120*, 379-83.
- Johnstone, R. W., Ruefli, A. A., and Lowe, S. W. (2002). Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell.* *108*, 153-64.
- Jones, P. A., and Baylin, S. B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet.* *3*, 415-28.
- Juin, P., Geneste, O., Raimbaud, E., and Hickman, J. A. (2004). Shooting at survivors: Bcl-2 family members as drug targets for cancer. *Biochim Biophys Acta.* *1644*, 251-60.
- Juin, P., Hunt, A., Littlewood, T., Griffiths, B., Swigart, L. B., Korsmeyer, S., and Evan, G. (2002). c-Myc functionally cooperates with Bax to induce apoptosis. *Mol Cell Biol.* *22*, 6158-69.
- Juin, P., Pelleschi, M., Sagne, C., Henry, J. P., Thieffry, M., and Vallette, F. M. (1995). Involvement of the peptide sensitive channel in the translocation of basic peptides into mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun.* *211*, 92-9.
- Kaiser, D. (1996). Bacteria also vote. *Science.* *272*, 1598-9.
- Kamer, I., Sarig, R., Zaltsman, Y., Niv, H., Oberkovitz, G., Regev, L., Haimovich, G., Lerenthal, Y., Marcellus, R. C., and Gross, A. (2005). Proapoptotic BID is an ATM effector in the DNA-damage response. *Cell.* *122*, 593-603.
- Karbowski, M., and Youle, R. J. (2003). Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ.* *10*, 870-80.
- Karlseder, J., Broccoli, D., Dai, Y., Hardy, S., and de Lange, T. (1999). p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science.* *283*, 1321-5.
- Karniely, S., and Pines, O. (2005). Single translation--dual destination: mechanisms of dual protein targeting in eukaryotes. *EMBO Rep.* *6*, 420-5.
- Kauffmann-Zeh, A., Rodriguez-Viciana, P., Ulrich, E., Gilbert, C., Coffey, P., Downward, J., and Evan, G. (1997). Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. *Nature.* *385*, 544-8.
- Kazhdan, I., Long, L., Montellano, R., Cavazos, D. A., and Marciniak, R. A. (2006). Targeted gene therapy for breast cancer with truncated Bid. *Cancer Gene Ther.* *13*, 141-9.
- Kerr, J. F., Winterford, C. M., and Harmon, B. V. (1994). Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer.* *73*, 2013-26.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* *26*, 239-57.
- Kerrigan, S. W., Gaur, M., Murphy, R. P., Shattil, S. J., and Leavitt, A. D. (2004). Caspase-12: a developmental link between G-protein-coupled receptors and integrin α IIb β 3 activation. *Blood.* *104*, 1327-34. Epub 2004 Apr 1.
- Khwaja, A., and Tatton, L. (1999). Resistance to the cytotoxic effects of tumor necrosis factor alpha can be overcome by inhibition of a FADD/caspase-dependent signaling pathway. *J Biol Chem.* *274*, 36817-23.
- Kikuchi, S., Shibuya, I., and Matsumoto, K. (2000). Viability of an *Escherichia coli* *pgsA* null mutant lacking detectable phosphatidylglycerol and cardiolipin. *J Bacteriol.* *182*, 371-6.

- Kim, H., Rafiuddin-Shah, M., Tu, H. C., Jeffers, J. R., Zambetti, G. P., Hsieh, J. J., and Cheng, E. H. (2006). Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat Cell Biol.* 8, 1348-58. Epub 2006 Nov 19.
- Kimchi, A. (2001). A cell death-promoting kinase. *Nat Struct Biol.* 8, 824-6.
- Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J.* 14, 5579-88.
- Klionsky, D. J., and Emr, S. D. (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290, 1717-21.
- Knudson, C. M., Johnson, G. M., Lin, Y., and Korsmeyer, S. J. (2001). Bax accelerates tumorigenesis in p53-deficient mice. *Cancer Res.* 61, 659-65.
- Kondo, Y., and Kondo, S. (2006). Autophagy and cancer therapy. *Autophagy.* 2, 85-90. Epub 2006 Apr 29.
- Konishi, A., Shimizu, S., Hirota, J., Takao, T., Fan, Y., Matsuoka, Y., Zhang, L., Yoneda, Y., Fujii, Y., Skoultchi, A. I., and Tsujimoto, Y. (2003). Involvement of histone H1.2 in apoptosis induced by DNA double-strand breaks. *Cell.* 114, 673-88.
- Koonin, E. V., and Aravind, L. (2002). Origin and evolution of eukaryotic apoptosis: the bacterial connection. *Cell Death Differ.* 9, 394-404.
- Korsmeyer, S. J., Wei, M. C., Saito, M., Weiler, S., Oh, K. J., and Schlesinger, P. H. (2000). Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ.* 7, 1166-73.
- Kothari, S., Cizeau, J., McMillan-Ward, E., Israels, S. J., Bailes, M., Ens, K., Kirshenbaum, L. A., and Gibson, S. B. (2003). BNIP3 plays a role in hypoxic cell death in human epithelial cells that is inhibited by growth factors EGF and IGF. *Oncogene.* 22, 4734-44.
- Kroemer, G., and Reed, J. C. (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nat Med.* 6, 513-9.
- Kroemer, G., and Reed, J. C. (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 6, 513-9.
- Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhiya, T., and Mizushima, N. (2004). The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature.* 432, 1032-6. Epub 2004 Nov 3.
- Kuwana, T., Mackey, M. R., Perkins, G., Ellisman, M. H., Latterich, M., Schneider, R., Green, D. R., and Newmeyer, D. D. (2002). Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* 111, 331-42.
- Ladokhin, A. S., Jayasinghe, S., and White, S. H. (2000). How to measure and analyze tryptophan fluorescence in membranes properly, and why bother? *Anal Biochem.* 285, 235-45.
- Ladokhin, A. S., and White, S. H. (2001). Protein chemistry at membrane interfaces: non-additivity of electrostatic and hydrophobic interactions. *J Mol Biol.* 309, 543-52.
- Lalier, L., Cartron, P. F., Juin, P., Nedelkina, S., Manon, S., Bechinger, B., and Vallette, F. M. (2007). Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis.* 12, 887-96.
- Lamkanfi, M., Declercq, W., Kalai, M., Saelens, X., and Vandenabeele, P. (2002). Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell Death Differ.* 9, 358-61.
- Lee, D. H., and Goldberg, A. L. (1998). Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol.* 8, 397-403.

- Leist, M., and Jaattela, M. (2001). Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 589-98.
- Leist, M., Single, B., Naumann, H., Fava, E., Simon, B., Kuhnle, S., and Nicotera, P. (1999). Inhibition of mitochondrial ATP generation by nitric oxide switches apoptosis to necrosis. *Exp Cell Res*. 249, 396-403.
- Lengauer, C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature*. 396, 643-9.
- Leu, J. I., Dumont, P., Hafey, M., Murphy, M. E., and George, D. L. (2004). Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat Cell Biol*. 6, 443-50. Epub 2004 Apr 11.
- Levi-Montalcini, R., Aloe, L., Mugnaini, E., Oesch, F., and Thoenen, H. (1975). Nerve growth factor induces volume increase and enhances tyrosine hydroxylase synthesis in chemically axotomized sympathetic ganglia of newborn rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 72, 595-9.
- Levine, A. J., Hu, W., and Feng, Z. (2006). The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differ*. 13, 1027-36.
- Levine, B. (2005). Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense. *Cell*. 120, 159-62.
- Li, H., Kolluri, S. K., Gu, J., Dawson, M. I., Cao, X., Hobbs, P. D., Lin, B., Chen, G., Lu, J., Lin, F., Xie, Z., Fontana, J. A., Reed, J. C., and Zhang, X. (2000). Cytochrome c release and apoptosis induced by mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3. *Science*. 289, 1159-64.
- Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S. I., Puc, J., Miliareis, C., Rodgers, L., McCombie, R., Bigner, S. H., Giovanella, B. C., Ittmann, M., Tycko, B., Hibshoosh, H., Wigler, M. H., and Parsons, R. (1997). PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*. 275, 1943-7.
- Li, L. Y., Luo, X., and Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412, 95-9.
- Li, M., Brooks, C. L., Wu-Baer, F., Chen, D., Baer, R., and Gu, W. (2003). Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science*. 302, 1972-5.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., and Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-89.
- Liang, X. H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., and Levine, B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*. 402, 672-6.
- Lin, B., Kolluri, S. K., Lin, F., Liu, W., Han, Y. H., Cao, X., Dawson, M. I., Reed, J. C., and Zhang, X. K. (2004). Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3. *Cell*. 116, 527-40.
- Lin, Y., Choksi, S., Shen, H. M., Yang, Q. F., Hur, G. M., Kim, Y. S., Tran, J. H., Nedospasov, S. A., and Liu, Z. G. (2004). Tumor necrosis factor-induced nonapoptotic cell death requires receptor-interacting protein-mediated cellular reactive oxygen species accumulation. *J Biol Chem*. 279, 10822-8. Epub 2003 Dec 29.
- Liston, P., Roy, N., Tamai, K., Lefebvre, C., Baird, S., Cherton-Horvat, G., Farahani, R., McLean, M., Ikeda, J. E., MacKenzie, A., and Korneluk, R. G. (1996). Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 379, 349-53.
- Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R., and Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86, 147-57.

- Liu, X., Van Vleet, T., and Schnellmann, R. G. (2004). The role of calpain in oncotic cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* *44*, 349-70.
- Llambi, F., Causeret, F., Bloch-Gallego, E., and Mehlen, P. (2001). Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC. *Embo J.* *20*, 2715-22.
- Lockshin, R. A., and Williams, C. M. (1965). Programmed Cell Death--I. Cytology of Degeneration in the Intersegmental Muscles of the Pernyi Silkworm. *J Insect Physiol.* *11*, 123-33.
- Lockshin, R. A., and Zakeri, Z. (2004). Apoptosis, autophagy, and more. *Int J Biochem Cell Biol.* *36*, 2405-19.
- Lockshin, R. A., and Zakeri, Z. (2001). Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nat Rev Mol Cell Biol* *2*, 545-50.
- Loeb, L. A., Loeb, K. R., and Anderson, J. P. (2003). Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* *100*, 776-81. Epub 2003 Jan 27.
- Loeffler, M., Daugas, E., Susin, S. A., Zamzami, N., Metivier, D., Nieminen, A. L., Brothers, G., Penninger, J. M., and Kroemer, G. (2001). Dominant cell death induction by extramitochondrially targeted apoptosis-inducing factor. *Faseb J* *15*, 758-67.
- Lowe, S. W., Bodis, S., McClatchey, A., Remington, L., Ruley, H. E., Fisher, D. E., Housman, D. E., and Jacks, T. (1994). p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science.* *266*, 807-10.
- Lowe, S. W., Cepero, E., and Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature.* *432*, 307-15.
- Lucken-Ardjomande, S., and Martinou, J. C. (2005). Newcomers in the process of mitochondrial permeabilization. *J Cell Sci.* *118*, 473-83.
- Lum, J. J., Bauer, D. E., Kong, M., Harris, M. H., Li, C., Lindsten, T., and Thompson, C. B. (2005). Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell.* *120*, 237-48.
- Luo, J. L., Maeda, S., Hsu, L. C., Yagita, H., and Karin, M. (2004). Inhibition of NF-kappaB in cancer cells converts inflammation-induced tumor growth mediated by TNFalpha to TRAIL-mediated tumor regression. *Cancer Cell.* *6*, 297-305.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* *94*, 481-90.
- Lutter, M., Fang, M., Luo, X., Nishijima, M., Xie, X., and Wang, X. (2000). Cardiolipin provides specificity for targeting of tBid to mitochondria. *Nat Cell Biol* *2*, 754-61.
- Lutter, M., Perkins, G. A., and Wang, X. (2001). The pro-apoptotic Bcl-2 family member tBid localizes to mitochondrial contact sites. *BMC Cell Biol* *2*, 22. Epub 2001 Nov 8.
- Maiuri, M. C., Le Toumelin, G., Criollo, A., Rain, J. C., Gautier, F., Juin, P., Tasdemir, E., Pierron, G., Troulinaki, K., Tavernarakis, N., Hickman, J. A., Geneste, O., and Kroemer, G. (2007). Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *Embo J.* *26*, 2527-2539. Epub 2007 Apr 19.
- Manero, F., Gautier, F., Gallenne, T., Cauquil, N., Gree, D., Cartron, P. F., Geneste, O., Gree, R., Vallette, F. M., and Juin, P. (2006). The small organic compound HA14-1 prevents Bcl-2 interaction with Bax to sensitize malignant glioma cells to induction of cell death. *Cancer Res.* *66*, 2757-64.
- Marchenko, N. D., Wolff, S., Erster, S., Becker, K., and Moll, U. M. (2007). Monoubiquitylation promotes mitochondrial p53 translocation. *Embo J.* *26*, 923-34. Epub 2007 Feb 1.
- Martin, D. A., Siegel, R. M., Zheng, L., and Lenardo, M. J. (1998). Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACHalpha1) death signal. *J Biol Chem.* *273*, 4345-9.

- Martinou, J. C., Desagher, S., and Antonsson, B. (2000). Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing. *Nat Cell Biol* 2, E41-3.
- Martinou, J. C., and Green, D. R. (2001). Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 63-7.
- Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Jurgensmeier, J. M., Susin, S. A., Vieira, H. L., Prevost, M. C., Xie, Z., Matsuyama, S., Reed, J. C., and Kroemer, G. (1998). Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science*. 281, 2027-31.
- Marzo, I., Susin, S. A., Petit, P. X., Ravagnan, L., Brenner, C., Larochette, N., Zamzami, N., and Kroemer, G. (1998). Caspases disrupt mitochondrial membrane barrier function. *FEBS Lett*. 427, 198-202.
- Matsuzaki, K., Sugishita, K., Ishibe, N., Ueha, M., Nakata, S., Miyajima, K., and Epand, R. M. (1998). Relationship of membrane curvature to the formation of pores by magainin 2. *Biochemistry*. 37, 11856-63.
- Mazelin, L., Bernet, A., Bonod-Bidaud, C., Pays, L., Arnaud, S., Gespach, C., Bredesen, D. E., Scoazec, J. Y., and Mehlen, P. (2004). Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis. *Nature*. 431, 80-4.
- McDonnell, T. J., and Korsmeyer, S. J. (1991). Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18). *Nature*. 349, 254-6.
- Mehlen, P. (2005). The dependence receptor notion: another way to see death. *Cell Death Differ*. 12, 1003.
- Mehlen, P., and Fearon, E. R. (2004). Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis. *J Clin Oncol*. 22, 3420-8.
- Meijer, A. J., and Codogno, P. (2004). Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 36, 2445-62.
- Melikyan, G. B., and Chernomordik, L. V. (1997). Membrane rearrangements in fusion mediated by viral proteins. *Trends Microbiol*. 5, 349-55.
- Melino, G., Bernassola, F., Ranalli, M., Yee, K., Zong, W. X., Corazzari, M., Knight, R. A., Green, D. R., Thompson, C., and Vousden, K. H. (2004). p73 Induces apoptosis via PUMA transactivation and Bax mitochondrial translocation. *J Biol Chem*. 279, 8076-83. Epub 2003 Nov 21.
- Merino, R., Ganan, Y., Macias, D., Rodriguez-Leon, J., and Hurle, J. M. (1999). Bone morphogenetic proteins regulate interdigital cell death in the avian embryo. *Ann N Y Acad Sci* 887, 120-32.
- Merlo, L. M., Pepper, J. W., Reid, B. J., and Maley, C. C. (2006). Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer*. 6, 924-35. Epub 2006 Nov 16.
- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P., and Moll, U. M. (2003). p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell*. 11, 577-90.
- Miller, L. K. (1997). Baculovirus interaction with host apoptotic pathways. *J Cell Physiol*. 173, 178-82.
- Mitsiades, C. S., Mitsiades, N., and Koutsilieris, M. (2004). The Akt pathway: molecular targets for anti-cancer drug development. *Curr Cancer Drug Targets*. 4, 235-56.
- Miyashita, T., and Reed, J. C. (1993). Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood*. 81, 151-7.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhiya, T., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2001). Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol*. 152, 657-68.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T., and Ohsumi, Y. (2004). In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell*. 15, 1101-11. Epub 2003 Dec 29.

- Moll, G. N., Brul, S., Konings, W. N., and Driessen, A. J. (2000). Comparison of the membrane interaction and permeabilization by the designed peptide Ac-MB21-NH2 and truncated dermaseptin S3. *Biochemistry*. 39, 11907-12.
- Moll, U. M., Marchenko, N., and Zhang, X. K. (2006). p53 and Nur77/TR3 - transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction. *Oncogene*. 25, 4725-43.
- Moretti, L., Attia, A., Kim, K. W., and Lu, B. (2007). Crosstalk between Bak/Bax and mTOR signaling regulates radiation-induced autophagy. *Autophagy*. 3, 142-4. Epub 2007 Mar 20.
- Moretti, L., Cha, Y. I., Niermann, K. J., and Lu, B. (2007). Switch between apoptosis and autophagy: radiation-induced endoplasmic reticulum stress? *Cell Cycle*. 6, 793-8. Epub 2007 Apr 20.
- Motoyama, N., and Naka, K. (2004). DNA damage tumor suppressor genes and genomic instability. *Curr Opin Genet Dev*. 14, 11-6.
- Muchmore, S. W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Yoon, H. S., Nettlesheim, D., Chang, B. S., Thompson, C. B., Wong, S. L., Ng, S. L., and Fesik, S. W. (1996). X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 381, 335-41.
- 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., and 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, 817-27.
- Nahle, Z., Polakoff, J., Davuluri, R. V., McCurrach, M. E., Jacobson, M. D., Narita, M., Zhang, M. Q., Lazebnik, Y., Bar-Sagi, D., and Lowe, S. W. (2002). Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F. *Nat Cell Biol*. 4, 859-64.
- Nakahara, S., Oka, N., and Raz, A. (2005). On the role of galectin-3 in cancer apoptosis. *Apoptosis*. 10, 267-75.
- Nicholls, P. (1974). Cytochrome c binding to enzymes and membranes. *Biochim Biophys Acta*. 346, 261-310.
- Nicholson, D. W., and Thornberry, N. A. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 22, 299-306.
- Nicotera, P., and Leist, M. (1997). Mitochondrial signals and energy requirement in cell death. *Cell Death Differ*. 4, 516.
- Nishimura, Y., and Lemasters, J. J. (2001). Glycine blocks opening of a death channel in cultured hepatic sinusoidal endothelial cells during chemical hypoxia. *Cell Death Differ*. 8, 850-8.
- Nomura, M., Shimizu, S., Sugiyama, T., Narita, M., Ito, T., Matsuda, H., and Tsujimoto, Y. (2003). 14-3-3 Interacts directly with and negatively regulates pro-apoptotic Bax. *J Biol Chem*. 278, 2058-65. Epub 2002 Nov 7.
- Norbury, C. J., and Zhivotovsky, B. (2004). DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene*. 23, 2797-808.
- Nossal, G. J. (1994). Negative selection of lymphocytes. *Cell*. 76, 229-39.
- Ogier-Denis, E., and Codogno, P. (2003). Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer. *Biochim Biophys Acta* 1603, 113-28.
- Ohtsuka, T., Nishijima, M., and Akamatsu, Y. (1993). A somatic cell mutant defective in phosphatidylglycerophosphate synthase, with impaired phosphatidylglycerol and cardiolipin biosynthesis. *J Biol Chem*. 268, 22908-13.
- Okada, H., and Mak, T. W. (2004). Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer* 4, 592-603.

- Oltersdorf, T., Elmore, S. W., Shoemaker, A. R., Armstrong, R. C., Augeri, D. J., Belli, B. A., Bruncko, M., Deckwerth, T. L., Dinges, J., Hajduk, P. J., Joseph, M. K., Kitada, S., Korsmeyer, S. J., Kunzer, A. R., Letai, A., Li, C., Mitten, M. J., Nettesheim, D. G., Ng, S., Nimmer, P. M., O'Connor, J. M., Oleksijew, A., Petros, A. M., Reed, J. C., Shen, W., Tahir, S. K., Thompson, C. B., Tomaselli, K. J., Wang, B., Wendt, M. D., Zhang, H., Fesik, S. W., and Rosenberg, S. H. (2005). An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature*. *435*, 677-81. Epub 2005 May 15.
- Ortiz, A., Killian, J. A., Verkleij, A. J., and Wilschut, J. (1999). Membrane fusion and the lamellar-to-inverted-hexagonal phase transition in cardiolipin vesicle systems induced by divalent cations. *Biophys J*. *77*, 2003-14.
- Ou, W. J., Ito, A., Umeda, M., Inoue, K., and Omura, T. (1988). Specific binding of mitochondrial protein precursors to liposomes containing cardiolipin. *J Biochem (Tokyo)*. *103*, 589-95.
- Pagliari, L. J., Kuwana, T., Bonzon, C., Newmeyer, D. D., Tu, S., Beere, H. M., and Green, D. R. (2005). The multidomain proapoptotic molecules Bax and Bak are directly activated by heat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. *102*, 17975-80. Epub 2005 Dec 5.
- Pardoll, D. (2003). Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu Rev Immunol*. *21*, 807-39. Epub 2001 Dec 19.
- Paroni, G., Henderson, C., Schneider, C., and Brancolini, C. (2002). Caspase-2 can trigger cytochrome C release and apoptosis from the nucleus. *J Biol Chem*. *277*, 15147-61. Epub 2002 Jan 31.
- Pastorino, J. G., Tafani, M., Rothman, R. J., Marcinkeviciute, A., Hoek, J. B., and Farber, J. L. (1999). Functional consequences of the sustained or transient activation by Bax of the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem*. *274*, 31734-9.
- Perfettini, J. L., Castedo, M., Roumier, T., Andreau, K., Nardacci, R., Piacentini, M., and Kroemer, G. (2005). Mechanisms of apoptosis induction by the HIV-1 envelope. *Cell Death Differ*. *12*, 916-23.
- Persson, D., Thoren, P. E., and Norden, B. (2001). Penetratin-induced aggregation and subsequent dissociation of negatively charged phospholipid vesicles. *FEBS Lett*. *505*, 307-12.
- Petiot, A., Ogier-Denis, E., Blommaert, E. F., Meijer, A. J., and Codogno, P. (2000). Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J Biol Chem*. *275*, 992-8.
- Petronilli, V., Miotto, G., Canton, M., Brini, M., Colonna, R., Bernardi, P., and Di Lisa, F. (1999). Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence. *Biophys J*. *76*, 725-34.
- Polcic, P., Su, X., Fowlkes, J., Blachly-Dyson, E., Dowhan, W., and Forte, M. (2005). Cardiolipin and phosphatidylglycerol are not required for the in vivo action of Bcl-2 family proteins. *Cell Death Differ*. *12*, 310-2.
- Pop, C., Fitzgerald, P., Green, D. R., and Salvesen, G. S. (2007). Role of proteolysis in caspase-8 activation and stabilization. *Biochemistry*. *46*, 4398-407. Epub 2007 Mar 20.
- Pouny, Y., Rapaport, D., Mor, A., Nicolas, P., and Shai, Y. (1992). Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry*. *31*, 12416-23.
- Putcha, G. V., Le, S., Frank, S., Besirli, C. G., Clark, K., Chu, B., Alix, S., Youle, R. J., LaMarche, A., Maroney, A. C., and Johnson, E. M., Jr. (2003). JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis. *Neuron*. *38*, 899-914.
- Puthalakath, H., Huang, D. C., O'Reilly, L. A., King, S. M., and Strasser, A. (1999). The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell* *3*, 287-96.
- Puthalakath, H., and Strasser, A. (2002). Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ*. *9*, 505-12.

- Puthalakath, H., Villunger, A., O'Reilly, L. A., Beaumont, J. G., Coultas, L., Cheney, R. E., Huang, D. C., and Strasser, A. (2001). Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science* 293, 1829-32.
- Quelle, D. E., Zindy, F., Ashmun, R. A., and 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.
- Raff, M. C. (1992). Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356, 397-400.
- Rampino, N., Yamamoto, H., Ionov, Y., Li, Y., Sawai, H., Reed, J. C., and Peruchio, M. (1997). Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science*. 275, 967-9.
- Raz, A., McLellan, W. L., Hart, I. R., Bucana, C. D., Hoyer, L. C., Sela, B. A., Dragsten, P., and Fidler, I. J. (1980). Cell surface properties of B16 melanoma variants with differing metastatic potential. *Cancer Res.* 40, 1645-51.
- Read, S. H., Baliga, B. C., Ekert, P. G., Vaux, D. L., and Kumar, S. (2002). A novel Apaf-1-independent putative caspase-2 activation complex. *J Cell Biol.* 159, 739-45. Epub 2002 Dec 2.
- Reed, J. C. (1997). Cytochrome c: can't live with it--can't live without it. *Cell.* 91, 559-62.
- Reed, J. C. (2006). Drug insight: cancer therapy strategies based on restoration of endogenous cell death mechanisms. *Nat Clin Pract Oncol.* 3, 388-98.
- Reef, S., and Kimchi, A. (2006). A smARF way to die: a novel short isoform of p19ARF is linked to autophagic cell death. *Autophagy.* 2, 328-30. Epub 2006 Oct 17.
- Renatus, M., Stennicke, H. R., Scott, F. L., Liddington, R. C., and Salvesen, G. S. (2001). Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 14250-5.
- Robertson, J. D., Gogvadze, V., Kropotov, A., Vakifahmetoglu, H., Zhivotovsky, B., and Orrenius, S. (2004). Processed caspase-2 can induce mitochondria-mediated apoptosis independently of its enzymatic activity. *EMBO Rep.* 5, 643-8. Epub 2004 May 21.
- Roth, J. A. (2006). Adenovirus p53 gene therapy. *Expert Opin Biol Ther.* 6, 55-61.
- Roy, N., Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S., and Reed, J. C. (1997). The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *Embo J* 16, 6914-25.
- Rudner, J., Belka, C., Marini, P., Wagner, R. J., Faltin, H., Lepple-Wienhues, A., Bamberg, M., and Budach, W. (2001). Radiation sensitivity and apoptosis in human lymphoma cells. *Int J Radiat Biol.* 77, 1-11.
- Ruoslahti, E., and Reed, J. C. (1994). Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. *Cell.* 77, 477-8.
- Ruvolo, P. P., Deng, X., and May, W. S. (2001). Phosphorylation of Bcl2 and regulation of apoptosis. *Leukemia.* 15, 515-22.
- Rytomaa, M., Mustonen, P., and Kinnunen, P. K. (1992). Reversible, nonionic, and pH-dependent association of cytochrome c with cardiolipin-phosphatidylcholine liposomes. *J Biol Chem.* 267, 22243-8.
- Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., van Gorp, M., van Loo, G., and Vandennebeele, P. (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene.* 23, 2861-74.
- Saito, M., Korsmeyer, S. J., and Schlesinger, P. H. (2000). BAX-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. *Nat Cell Biol* 2, 553-5.
- Sakahira, H., Enari, M., and Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature.* 391, 96-9.

- Sakamuro, D., Eviner, V., Elliott, K. J., Showe, L., White, E., and Prendergast, G. C. (1995). c-Myc induces apoptosis in epithelial cells by both p53-dependent and p53-independent mechanisms. *Oncogene*. *11*, 2411-8.
- Salinas, S., Briancon-Marjollet, A., Bossis, G., Lopez, M. A., Piechaczyk, M., Jariel-Encontre, I., Debant, A., and Hipskind, R. A. (2004). SUMOylation regulates nucleo-cytoplasmic shuttling of Elk-1. *J Cell Biol*. *165*, 767-73.
- Salvesen, G. S., and Dixit, V. M. (1997). Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*. *91*, 443-6.
- Salvesen, G. S., and Duckett, C. S. (2002). IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* *3*, 401-10.
- Samali, A., Zhivotovsky, B., Jones, D., Nagata, S., and Orrenius, S. (1999). Apoptosis: cell death defined by caspase activation. *Cell Death Differ*. *6*, 495-6.
- Saunders, J. W., Jr. (1966). Death in embryonic systems. *Science*. *154*, 604-12.
- Sawada, M., Hayes, P., and Matsuyama, S. (2003). Cytoprotective membrane-permeable peptides designed from the Bax-binding domain of Ku70. *Nat Cell Biol*. *5*, 352-7.
- Scaduto, R. C., Jr., and Grotyohann, L. W. (1999). Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophys J*. *76*, 469-77.
- Scorrano, L., Ashiya, M., Buttle, K., Weiler, S., Oakes, S. A., Mannella, C. A., and Korsmeyer, S. J. (2002). A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev Cell* *2*, 55-67.
- Searle, J., Lawson, T. A., Abbott, P. J., Harmon, B., and 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*, 129-38.
- Seglen, P. O., and Bohley, P. (1992). Autophagy and other vacuolar protein degradation mechanisms. *Experientia*. *48*, 158-72.
- Semenza, G. L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. *3*, 721-32.
- Shimizu, S., Eguchi, Y., Kamiike, W., Waguri, S., Uchiyama, Y., Matsuda, H., and Tsujimoto, Y. (1996). Retardation of chemical hypoxia-induced necrotic cell death by Bcl-2 and ICE inhibitors: possible involvement of common mediators in apoptotic and necrotic signal transductions. *Oncogene*. *12*, 2045-50.
- Shimizu, S., Ide, T., Yanagida, T., and Tsujimoto, Y. (2000). Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c. *J Biol Chem* *275*, 12321-5.
- Shimizu, S., Kanaseki, T., Mizushima, N., Mizuta, T., Arakawa-Kobayashi, S., Thompson, C. B., and Tsujimoto, Y. (2004). Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol*. *6*, 1221-8. Epub 2004 Nov 21.
- Sjoblom, T., Jones, S., Wood, L. D., Parsons, D. W., Lin, J., Barber, T. D., Mandelker, D., Leary, R. J., Ptak, J., Silliman, N., Szabo, S., Buckhaults, P., Farrell, C., Meeh, P., Markowitz, S. D., Willis, J., Dawson, D., Willson, J. K., Gazdar, A. F., Hartigan, J., Wu, L., Liu, C., Parmigiani, G., Park, B. H., Bachman, K. E., Papadopoulos, N., Vogelstein, B., Kinzler, K. W., and Velculescu, V. E. (2006). The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science*. *314*, 268-74. Epub 2006 Sep 7.
- Slamon, D. J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., Baselga, J., and Norton, L. (2001). Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*. *344*, 783-92.

- Sperandio, S., de Belle, I., and Bredesen, D. E. (2000). An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14376-81.
- Sporn, M. B. (1996). The war on cancer. *Lancet*. 347, 1377-81.
- Stambolsky, P., Weisz, L., Shats, I., Klein, Y., Goldfinger, N., Oren, M., and Rotter, V. (2006). Regulation of AIF expression by p53. *Cell Death Differ.* 13, 2140-9. Epub 2006 May 26.
- Stone, S., Jiang, P., Dayananth, P., Tavtigian, S. V., Katcher, H., Parry, D., Peters, G., and Kamb, A. (1995). Complex structure and regulation of the P16 (MTS1) locus. *Cancer Res* 55, 2988-94.
- Strasser, A., Harris, A. W., Bath, M. L., and Cory, S. (1990). Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature*. 348, 331-3.
- Strasser, A., Whittingham, S., Vaux, D. L., Bath, M. L., Adams, J. M., Cory, S., and Harris, A. W. (1991). Enforced BCL2 expression in B-lymphoid cells prolongs antibody responses and elicits autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88, 8661-5.
- Stupack, D. G. (2005). Integrins as a distinct subtype of dependence receptors. *Cell Death Differ.* 12, 1021-30.
- Susin, S. A., Daugas, E., Ravagnan, L., Samejima, K., Zamzami, N., Loeffler, M., Costantini, P., Ferri, K. F., Irinopoulou, T., Prevost, M. C., Brothers, G., Mak, T. W., Penninger, J., Earnshaw, W. C., and Kroemer, G. (2000). Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med.* 192, 571-80.
- 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., and Kroemer, G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-6.
- Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K., and Takahashi, R. (2001). A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell*. 8, 613-21.
- Szoka, F., Jr., and Papahadjopoulos, D. (1978). Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 75, 4194-8.
- Tafani, M., Cohn, J. A., Karpnich, N. O., Rothman, R. J., Russo, M. A., and Farber, J. L. (2002). Regulation of intracellular pH mediates Bax activation in HeLa cells treated with staurosporine or tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem*. 277, 49569-76. Epub 2002 Oct 18.
- Takeda, K., Smyth, M. J., Cretney, E., Hayakawa, Y., Yamaguchi, N., Yagita, H., and Okumura, K. (2001). Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in NK cell-mediated and IFN-gamma-dependent suppression of subcutaneous tumor growth. *Cell Immunol*. 214, 194-200.
- Talanian, R. V., Quinlan, C., Trautz, S., Hackett, M. C., Mankovich, J. A., Banach, D., Ghayur, T., Brady, K. D., and Wong, W. W. (1997). Substrate specificities of caspase family proteases. *J Biol Chem*. 272, 9677-82.
- Tarahovsky, Y. S., Arsenault, A. L., MacDonald, R. C., McIntosh, T. J., and Epan, R. M. (2000). Electrostatic control of phospholipid polymorphism. *Biophys J*. 79, 3193-200.
- Terrones, O., Antonsson, B., Yamaguchi, H., Wang, H. G., Liu, J., Lee, R. M., Herrmann, A., and Basanez, G. (2004). Lipidic pore formation by the concerted action of proapoptotic BAX and tBID. *J Biol Chem*. 279, 30081-91. Epub 2004 May 11.
- Thibodeau, S. N., Bren, G., and Schaid, D. (1993). Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science*. 260, 816-9.
- Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 267, 1456-62.
- Tinel, A., and Tschopp, J. (2004). The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science*. 304, 843-6. Epub 2004 Apr 8.

- Tsujimoto, Y. (1997). Apoptosis and necrosis: intracellular ATP level as a determinant for cell death modes. *Cell Death Differ.* *4*, 429-34.
- Tsujimoto, Y., and Croce, C. M. (1986). Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* *83*, 5214-8.
- Uren, R. T., Dewson, G., Bonzon, C., Lithgow, T., Newmeyer, D. D., and Kluck, R. M. (2005). Mitochondrial release of pro-apoptotic proteins: electrostatic interactions can hold cytochrome c but not Smac/DIABLO to mitochondrial membranes. *J Biol Chem.* *280*, 2266-74. Epub 2004 Nov 9.
- Vahsen, N., Cande, C., Dupaigne, P., Giordanetto, F., Kroemer, R. T., Herker, E., Scholz, S., Modjtahedi, N., Madeo, F., Le Cam, E., and Kroemer, G. (2006). Physical interaction of apoptosis-inducing factor with DNA and RNA. *Oncogene.* *25*, 1763-74.
- Vakkila, J., and Lotze, M. T. (2004). Inflammation and necrosis promote tumour growth. *Nat Rev Immunol.* *4*, 641-8.
- Valette, F. M., Juin, P., Pelleschi, M., and Henry, J. P. (1994). Basic peptides can be imported into yeast mitochondria by two distinct targeting pathways. Involvement of the peptide-sensitive channel of the outer membrane. *J Biol Chem.* *269*, 13367-74.
- Van de Craen, M., Declercq, W., Van den brande, I., Fiers, W., and Vandenabeele, P. (1999). The proteolytic procaspase activation network: an in vitro analysis. *Cell Death Differ.* *6*, 1117-24.
- van Loo, G., Schotte, P., van Gurp, M., Demol, H., Hoorelbeke, B., Gevaert, K., Rodriguez, I., Ruiz-Carrillo, A., Vandekerckhove, J., Declercq, W., Beyaert, R., and Vandenabeele, P. (2001). Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Differ* *8*, 1136-42.
- Van Poznak, C., Seidman, A. D., Reidenberg, M. M., Moasser, M. M., Sklarin, N., Van Zee, K., Borgen, P., Gollub, M., Bacotti, D., Yao, T. J., Bloch, R., Ligueros, M., Sonenberg, M., Norton, L., and Hudis, C. (2001). Oral gossypol in the treatment of patients with refractory metastatic breast cancer: a phase I/II clinical trial. *Breast Cancer Res Treat.* *66*, 239-48.
- Vande Velde, C., Cizeau, J., Dubik, D., Alimonti, J., Brown, T., Israels, S., Hakem, R., and Greenberg, A. H. (2000). BNIP3 and genetic control of necrosis-like cell death through the mitochondrial permeability transition pore. *Mol Cell Biol.* *20*, 5454-68.
- Vandenabeele, P., Vanden Berghe, T., and Festjens, N. (2006). Caspase inhibitors promote alternative cell death pathways. *Sci STKE.* *2006*, e44.
- Vander Heiden, M. G., Chandel, N. S., Williamson, E. K., Schumacker, P. T., and Thompson, C. B. (1997). Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell.* *91*, 627-37.
- Varfolomeev, E. E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannikulchai, N., Beckmann, J. S., Mett, I. L., Rebrikov, D., Brodianski, V. M., Kemper, O. C., Kollet, O., Lapidot, T., Soffer, D., Sobe, T., Avraham, K. B., Goncharov, T., Holtmann, H., Lonai, P., and Wallach, D. (1998). Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity.* *9*, 267-76.
- Vaux, D. L. (2002). Apoptosis timeline. *Cell Death Differ.* *9*, 349-54.
- Vaux, D. L., Cory, S., and Adams, J. M. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* *335*, 440-2.
- von Ahsen, O., Renken, C., Perkins, G., Kluck, R. M., Bossy-Wetzler, E., and Newmeyer, D. D. (2000). Preservation of mitochondrial structure and function after Bid- or Bax-mediated cytochrome c release. *J Cell Biol* *150*, 1027-36.
- Wang, C. W., and Klionsky, D. J. (2003). The molecular mechanism of autophagy. *Mol Med.* *9*, 65-76.

- Wang, K. K. (2000). Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci.* *23*, 20-6.
- Wang, P., Valentijn, A. J., Gilmore, A. P., and Streuli, C. H. (2003). Early events in the anoikis program occur in the absence of caspase activation. *J Biol Chem.* *278*, 19917-25. Epub 2003 Mar 5.
- Wasiak, S., Zunino, R., and McBride, H. M. (2007). Bax/Bak promote sumoylation of DRP1 and its stable association with mitochondria during apoptotic cell death. *J Cell Biol.* *177*, 439-50. Epub 2007 Apr 30.
- Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Nagata, S. (1992). Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature.* *356*, 314-7.
- Waterhouse, N. J., Goldstein, J. C., von Ahsen, O., Schuler, M., Newmeyer, D. D., and Green, D. R. (2001). Cytochrome c maintains mitochondrial transmembrane potential and ATP generation after outer mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process. *J Cell Biol.* *153*, 319-28.
- Webster, K. A., Graham, R. M., and Bishopric, N. H. (2005). BNip3 and signal-specific programmed death in the heart. *J Mol Cell Cardiol.* *38*, 35-45. Epub 2004 Dec 13.
- Wendel, H. G., De Stanchina, E., Fridman, J. S., Malina, A., Ray, S., Kogan, S., Cordon-Cardo, C., Pelletier, J., and Lowe, S. W. (2004). Survival signalling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy. *Nature.* *428*, 332-7.
- White, E., Grodzicker, T., and Stillman, B. W. (1984). Mutations in the gene encoding the adenovirus early region 1B 19,000-molecular-weight tumor antigen cause the degradation of chromosomal DNA. *J Virol.* *52*, 410-9.
- White, S. H., and Wimley, W. C. (1999). Membrane protein folding and stability: physical principles. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* *28*, 319-65.
- Whitman, S., Wang, X., Shalaby, R., and Shtivelman, E. (2000). Alternatively spliced products CC3 and TC3 have opposing effects on apoptosis. *Mol Cell Biol.* *20*, 583-93.
- Widlak, P., Li, L. Y., Wang, X., and Garrard, W. T. (2001). Action of recombinant human apoptotic endonuclease G on naked DNA and chromatin substrates: cooperation with exonuclease and DNase I. *J Biol Chem.* *276*, 48404-9. Epub 2001 Oct 17.
- Williams, G. T. (1991). Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. *Cell.* *65*, 1097-8.
- Willis, S. N., Fletcher, J. I., Kaufmann, T., van Delft, M. F., Chen, L., Czabotar, P. E., Ierino, H., Lee, E. F., Fairlie, W. D., Bouillet, P., Strasser, A., Kluck, R. M., Adams, J. M., and Huang, D. C. (2007). Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science.* *315*, 856-9.
- Wilson, A. J., Arango, D., Mariadason, J. M., Heerdt, B. G., and Augenlicht, L. H. (2003). TR3/Nur77 in colon cancer cell apoptosis. *Cancer Res.* *63*, 5401-7.
- Wireman, J. W., and Dworkin, M. (1977). Developmentally induced autolysis during fruiting body formation by *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol.* *129*, 798-802.
- Wooster, R., Bignell, G., Lancaster, J., Swift, S., Seal, S., Mangion, J., Collins, N., Gregory, S., Gumbs, C., and Micklem, G. (1995). Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature.* *378*, 789-92.
- Wu, X., and Frost, J. A. (2006). Multiple Rho proteins regulate the subcellular targeting of PAK5. *Biochem Biophys Res Commun.* *351*, 328-35. Epub 2006 Oct 17.
- Xue, L., Fletcher, G. C., and Tolkovsky, A. M. (2001). Mitochondria are selectively eliminated from eukaryotic cells after blockade of caspases during apoptosis. *Curr Biol.* *11*, 361-5.

- Yamaguchi, H., and Wang, H. G. (2002). Bcl-XL protects BimEL-induced Bax conformational change and cytochrome C release independent of interacting with Bax or BimEL. *J Biol Chem.* 277, 41604-12. Epub 2002 Aug 26.
- Yang, E., and Korsmeyer, S. J. (1996). Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* 88, 386-401.
- Yarmolinsky, M. B. (1995). Programmed cell death in bacterial populations. *Science.* 267, 836-7.
- Ye, H., Cande, C., Stephanou, N. C., Jiang, S., Gurbuxani, S., Larochette, N., Daugas, E., Garrido, C., Kroemer, G., and Wu, H. (2002). DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat Struct Biol* 9, 680-4.
- Yorimitsu, T., and Klionsky, D. J. (2007). Endoplasmic reticulum stress: a new pathway to induce autophagy. *Autophagy.* 3, 160-2. Epub 2007 Mar 4.
- Yoshimori, T. (2004). Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 313, 453-8.
- Youle, R. J., and Karbowski, M. (2005). Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6, 657-63.
- Yu, L., Alva, A., Su, H., Dutt, P., Freundt, E., Welsh, S., Baehrecke, E. H., and Lenardo, M. J. (2004). Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science.* 304, 1500-2. Epub 2004 May 6.
- Yu, S. W., Wang, H., Poitras, M. F., Coombs, C., Bowers, W. J., Federoff, H. J., Poirier, G. G., Dawson, T. M., and Dawson, V. L. (2002). Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science.* 297, 259-63.
- Zamzami, N., and Kroemer, G. (2001). The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 67-71.
- Zermati, Y., Garrido, C., Amsellem, S., Fishelson, S., Bouscary, D., Valensi, F., Varet, B., Solary, E., and Hermine, O. (2001). Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J Exp Med.* 193, 247-54.
- Zeuner, A., Eramo, A., Peschle, C., and De Maria, R. (1999). Caspase activation without death. *Cell Death Differ.* 6, 1075-80.
- Zha, J., Weiler, S., Oh, K. J., Wei, M. C., and Korsmeyer, S. J. (2000). Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis. *Science.* 290, 1761-5.
- Zhang, J., Cado, D., Chen, A., Kabra, N. H., and Winoto, A. (1998). Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature.* 392, 296-300.
- Zhang, X., Mar, V., Zhou, W., Harrington, L., and Robinson, M. O. (1999). Telomere shortening and apoptosis in telomerase-inhibited human tumor cells. *Genes Dev.* 13, 2388-99.
- Zhivotovsky, B., and Kroemer, G. (2004). Apoptosis and genomic instability. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5, 752-62.
- Zhivotovsky, B., and Orrenius, S. (2005). Caspase-2 function in response to DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun.* 331, 859-67.
- Zhou, X., and Arthur, G. (1992). Improved procedures for the determination of lipid phosphorus by malachite green. *J Lipid Res.* 33, 1233-6.
- Ziegler, T., Silacci, P., Harrison, V. J., and Hayoz, D. (1998). Nitric oxide synthase expression in endothelial cells exposed to mechanical forces. *Hypertension.* 32, 351-5.

Zindy, F., Eischen, C. M., Randle, D. H., Kamijo, T., Cleveland, J. L., Sherr, C. J., and Roussel, M. F. (1998). Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev.* *12*, 2424-33.

Zinkel, S. S., Hurov, K. E., Ong, C., Abtahi, F. M., Gross, A., and Korsmeyer, S. J. (2005). A role for proapoptotic BID in the DNA-damage response. *Cell.* *122*, 579-91.

Zong, W. X., Ditsworth, D., Bauer, D. E., Wang, Z. Q., and Thompson, C. B. (2004). Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. *Genes Dev.* *18*, 1272-82. Epub 2004 May 14.

Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A., and Wang, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* *90*, 405-13.

Résumé :

La mitogaligine est une protéine codée par *galig*, un nouveau gène cytotoxique. Les résultats précédemment obtenus indiquent que cette protéine, adressée aux mitochondries, induit la fuite vers le cytoplasme d'un effecteur pro-apoptotique mitochondrial, le cytochrome c. Cette nouvelle étude suggère tout d'abord, que l'interaction directe de la mitogaligine avec la cardiolipine, un phospholipide spécifique des mitochondries, puisse être à l'origine de la destabilisation des membranes mitochondriales, et expliquer ainsi la fuite de cytochrome c. Ce faisceau de résultats indique que la cytotoxicité de *galig* est associée à l'action de la mitogaligine sur les mitochondries. Dans une seconde partie, la mort cellulaire induite par la mitogaligine a été caractérisée. Bien que les mitochondries soient précocement altérées, il apparaît que la mitogaligine puisse également être adressée au noyau des cellules, et induire la mort cellulaire à partir de ce compartiment. Ces résultats suggèrent que l'activité cytotoxique de la mitogaligine puisse être régulée par son adressage subcellulaire.

Mots clés : mitogaligine, *galig*, cytochrome c, mitochondries, cardiolipine, apoptose, noyau.

Disciplines : Biophysique, Biologie cellulaire, Biologie moléculaire

Equipe : « Caractérisation et mécanismes d'action de nouvelles protéines cytotoxiques humaines »

Adresse du laboratoire : Centre de Biophysique Moléculaire
Rue Charles Sadron
45071 ORLEANS cédex 02