GALIG : UN NOUVEAU GÈNE HUMAIN INDUCTEUR DE LA MORT CELLULAIRE
Mélanie Duneau

To cite this version:
Mélanie Duneau. GALIG : UN NOUVEAU GÈNE HUMAIN INDUCTEUR DE LA MORT CELLULAIRE. domain_other. Université d’Orléans, 2005. Français. <tel-00010769>

HAL Id: tel-00010769
https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00010769
Submitted on 26 Oct 2005

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L’archive ouverte pluridisciplinaire HAL, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d’enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.
Thèse
présentée à
L’Université d’Orléans
pour obtenir le grade de
Docteur de l’Université d’Orléans
Biologie et Biophysique Moléculaires et Cellulaires
Par
Mélanie DUNEAU

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

Soutenue le 2005
Membres du Jury :
-M. Christian-Jacques LARSEN, Rapporteur/Université de Poitiers
-M. François VALLETTE, Rapporteur/INSERM
-M. Jérôme DELON, Examinateur/CNRS
-M. Francis DELMOTTE, Examinateur/Université d'Orléans
-M. Alain LEGRAND, Directeur de thèse/Université d'Orléans.
# TABLE DES MATIERES

**TABLE DES MATIERES**

______________________________ 2

**ABREVIATIONS**

______________________________ 6

**INTRODUCTION**

______________________________ 8

**GENERALITES**

______________________________ 10

I. La mort cellulaire programmée : un concept récent. ___________________________ 11

II. Pourquoi contrôler la mort cellulaire ? ________________________________ 15

III. La mort cellulaire : une question de formes… ____________________________ 18

IV. Quelques acteurs moléculaires de la MCP. ________________________________ 25

1. Les protéines de la famille Bcl-2 : le ying et le yang de la MCP. _______________ 26

  1.1. Caractéristiques structurales. _______________ 26

  1.2. Modes d’action des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2. _______________ 28

  1.3. Régulation de l’activité des protéines de la famille Bcl-2. _______________ 34

2. La libération extra-mitochondriale de facteurs pro-apoptotiques : armes fatales ! _______________ 39

  2.1. Cytochrome c. _______________ 39

  2.2. AIF. _______________ 40

  2.3. Endonucléase G. _______________ 40

  2.4. Smac/DIABLO. _______________ 41

  2.5. Htra2/Omi. _______________ 41

  2.6. ROS. _______________ 42

3. Les caspases : la cascade de la mort ! _______________________________ 43

  3.1. Structure des caspases. _______________ 43

  3.2. Modes d’activation des caspases. _______________ 44

  3.3. Les substrats des caspases. _______________ 49

  3.4. Les inhibiteurs des caspases: antidotes de la mort ! _______________ 52

  3.5. Une voie de MCP indépendante des caspases. _______________ 55

4. Le calcium : un autre agent double ! _______________________________ 60

  4.1. Causes d’une augmentation de [Ca$^{2+}$]c dans la MCP. _______________ 60

  4.2. Conséquences d’une augmentation de [Ca$^{2+}$]c dans la MCP. _______________ 60

5. Phosphatidylsérine : mangez moi ! _______________________________ 62

V. Mort cellulaire et pathologies. _______________________________ 63

1. Le cancer. ___________________________________________ 64

  1.1. Cancer et apoptose. ___________________________________________ 64

  1.2. Cancer et autophagie cellulaire. ___________________________________________ 67

2. Le SIDA. ___________________________________________ 68

2
# TABLE DES MATIERES.

3. Les maladies dégénératives. ........................................................................................................ 69

**RESULTATS** ................................................................................................................................. 70

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

1. Le locus du gène de la galectine-3 (LGALS3). ......................................................................... 68
2. Un ARNm, deux ORFs et deux protéines exprimées : la mitogaligine et la cytogaligine. ...... 69
3. Expression tissulaire différentielle des transcrits du gène galig. ........................................... 72
4. Effets cellulaires induits par l’expression du gène galig. ........................................................... 73

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

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

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

1. Modifications de la membrane plasmique. .............................................................................. 87
   1.1. Matériel et méthodes. ........................................................................................................ 88
   1.2. Résultat. ........................................................................................................................... 90
2. Modifications nucléaires. ........................................................................................................... 90
   2.1. Condensation de la chromatine. ...................................................................................... 90
   2.2. Clivage de l’ADN. ............................................................................................................ 91
3. Altérations des mitochondries. .................................................................................................. 94
4. Caractéristiques biochimiques. .................................................................................................. 95
   4.1. Libération du cytochrome c. ............................................................................................ 95
   4.2. Activation des caspases. ................................................................................................... 95
5. Galig et les protéines Bcl-2 et Bcl-XL. ..................................................................................... 100
   5.1. Matériel et méthodes. ...................................................................................................... 100
   5.2. Résultat. .......................................................................................................................... 101
   5.3. Conclusion. ..................................................................................................................... 102
6. Conclusions. .............................................................................................................................. 103

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

1. Matériel et méthodes. ............................................................................................................... 104
   1.1. Culture cellulaire, transfection transitoire. ...................................................................... 104
   1.2. Détecton du cytochrome c cytosolique. ........................................................................... 105
2. Résultat. .................................................................................................................................... 105
3. Conclusion. ................................................................................................................................ 105

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

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

1. Matériel et méthodes. ............................................................................................................... 106
# TABLE DES MATIERES

1. Construction des vecteurs. ................................................................. 106
2. Vérification et amplification des vecteurs. ...................................... 109
1.3. Culture cellulaire, transfection transitoire, microscopie de fluorescence. 110
2. Résultat. ......................................................................................... 110
2.1. Extrémité N-terminale. ............................................................... 110
2.2. Extrémité C-terminale. ............................................................... 112
3. Conclusion. ..................................................................................... 113

II. Localisation mitochondriale et fuite de cytochrome c. ......................... 114

1. Libération de cytochrome c associée aux formes délétées en N et C-terminales de la mitogaligine. 114
   1.1. Matériel et méthodes. ............................................................... 114
   1.2. Résultat. ................................................................................. 114
   1.3. Conclusion. ............................................................................. 115
2. Libération de cytochrome c associée à l’expression d’une seule ou des deux protéines codées par galig. 115
   2.1. Matériel et méthodes. ............................................................... 115
   2.2. Résultat. ................................................................................. 116
   2.3. Conclusion. ............................................................................. 117

CHAPITRE 3 : Production d’anticorps dirigés contre la cytогaligine. ............... 118

I. Production des protéines recombinantes chez E. coli. ................................. 119

1. Construction du vecteur pPROCLR (His-Cytогaligine). ....................... 119
2. Production des protéines recombinantes comportant une "étiquette" Histidine. 119
3. Immunisation. ................................................................................ 120
4. Immunodétection de la cytогaligine. .................................................. 121
   4.1. Test des anti-sérums par Western-Blot. ...................................... 121
   4.2. Utilisation des sérums anti-cytогaligine en immunofluorescence. 125

Chapitre 4 : Etude de l’initiation de traduction de la cytогaligine. .................... 131

I. Introduction. ..................................................................................... 131

II. Initiation de traduction de la cytогaligine dans l’ARNm leader du petit ARNm de galig. 136

1. Matériel et méthodes. .................................................................... 136
   1.1. Constructions des différents vecteurs. ...................................... 136
   1.2. Résultat. ................................................................................. 137
   1.3. Conclusion. ............................................................................. 138

CHAPITRE 5 : Détection des ARNm de galig par RT-PCR quantitative. ............... 139

I. Principe. ......................................................................................... 139

II. Quantification des ARNm de galig. .................................................... 140
TABLE DES MATIERES.

1. Matériel et méthodes. ____________________________________________________________ 140
   1.1. Contrôle des amorces __________________________________________________________ 140
   1.2. PCR _______________________________ 141
2. Résultat. ______________________________________________________________________ 142
   2.1. Calibration. ________________________________________________________________ 142
   2.2. Expression de galig après incubation des THP1 avec le PMA. _______________________ 143

DISCUSSION, CONCLUSION et PERSPECTIVES __________ 146

I. Galig et mort cellulaire. ___________________________________________________________ 147
   1. Effet de l’expression de galig sur la morphologie cellulaire. _______________________ 147
   2. Le rôle de la mitochondrie dans la mort cellulaire induite par galig. ________________ 148
      2.1. Activation des caspases. ____________________________________________________ 148
      2.2. Potentiel membranaire mitochondrial. __________________________________________ 149
   3. Galig et marqueurs de l’apoptose. _______________________________________________ 150
      3.1. Marquage à l’annexine V. ___________________________________________________ 150
      3.2. Marquage Hoechst 33342. __________________________________________________ 150
      3.3. Test TUNEL. _____________________________________________________________ 150
      3.4. Inhibition de la mort cellulaire induite par galig. _____________________________ 151

II. Implication de la mitogaligine dans la mort cellulaire induite par galig. ______________ 154
   1. Localisation intracellulaire de la mitogaligine. ____________________________________ 154
   2. Activité cytotoxique de la mitogaligine. __________________________________________ 154
      2.1. Expression de la mitogaligine et croissance cellulaire. _________________________ 154
      2.2. La mitogaligine induit la libération du cytochrome c. __________________________ 154
   3. Importance de la production des deux protéines codées par galig. ___________________ 156

III. La régulation de l’expression du gène galig. _________________________________________ 157

ANNEXES __________________________________________________________________________ 159

BIBLIOGRAPHIE _______________________________________________________________ 160

RESUME. ________________________________________________________________ 180
ABREVIATIONS

A

aa : acide aminé
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
ADNm : ADN mitochondrial
ADP : Adénosine Di-phosphate
AIF : Apoptosis Inducing Factor
ANT : Adenine Nucleotide Translocator
Apaf-1 : Apoptotic protease activating factor-1
ARN : Acide Ribonucléique
ARNm : ARN messager
ART : Apoptosis-Regulating Targeting sequence.
ATP : Adénosine Tri-Phosphate

B

Bak : Bcl-2 antagonist killer
BAP 31 : B-Cell Receptor Associated Protein
Bax : Bcl-2 Antagonist X
Bcl-2 : B cell lymphoma 2
Bcl-Xl : Bcl-2 homologue Long
BET : Bromure d’éthidium
BH : Bcl-2 Homology region
BIR : Baculovirus IAP Repeat

C

CAD : Caspase-Activated DNase
Caspase : Cystéine ASPartate protéase ASE
CARD : Caspase Recruitment Domain
CDKN : Cycline-Dependent Kinase Inhibitor
Ced : Caenorhabditis Elegans Death / CELl Death abnormal
CG : Cytopagaline
CMV : Cytomégalovirus
CrmA : Cytokine response modifier A
Cyt c : Cytochrome c
Ct : Threshold Cycle

D

Da : Dalton
DD : Death Domain
DED : Death Effector Domain
DIABLO : Direct IAP-Binding protein with LOW pI
DISC : Death Inducing Signalling Complex
DO : Densité Optique
Drp-1 : Dynamin-related protein-1

ΔΨm : Différence de potentiel électrochimique de la membrane mitochondriale

E

EDTA : Éthylène diamine tétra acétate
Egl-1 : Egg laying abnormal 1
EGFP : Enhanced Green Fluorescent Protein

F

FADD : Fas Associated Death Domain

G

Galig : galectin-3 internal gene
GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydréngénase humaine

H

Htr A2 : High temperature requirement A2.
Hsp : Heat shock protein

I

IAP : Inhibitors of Apoptosis Proteins
ICAD : Inhibitor of Caspase-Activated DNase
ICE : Interleukin-1 b Converting Enzyme
IGF : Insulin Growth Factor
IGF 1R : Insulin Growth Factor Receptor
Il : Interleukine
InsP3 : Inositol-1,4,5-triphosphate
IPTG : Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
IRES : Internal Ribosome Entry Site

J

LB : Luria-Bertani
LTc : Lymphocyte Toxicity

K

LGALS3 : Locus du gène de la galectine-3
Luc : Luciférase
ABREVIATIONS.

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

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

O
ORF: Open Reading Frame

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

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

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

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

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

XIAP: X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein

z-VAD-fmk: Carbobenzoxy-V(val)-A(ala)-D(asp)-fluoromethylketon
Les travaux présentés dans cette thèse font suite aux études antérieures effectuées au laboratoire concernant la régulation de l’expression du gène de la galectine-3 (gène LGALS3). La galectine-3 appartient à la famille des lectines. Une lectine (du latin legere : choisir) est une protéine, autre qu’une enzyme ou un anticorps, fixant spécifiquement des osides (Barondes et al., 1994). Les galectines se lient de façon spécifique aux B-galactosides. La galectine-3 est une lectine soluble localisée dans le cytosol et le noyau, également associée à la membrane plasmique et sécrétée dans le milieu extracellulaire. Elle est impliquée dans les phénomènes d’adhésion (Sato et al., 1993), de prolifération (Hamann et al., 1991), et possède aussi des propriétés anti-apoptotiques (Akahani et al., 1997; Yang et al., 1996). L’étude de l’expression du gène LGALS3 dans des lignées cellulaires humaines a révélé la présence, en plus d’ARNm codant la galectine-3, de transcrits initiés dans le second intron du gène LGALS3 (Raimond et al., 1995) (figure 1).

La spécificité d’expression tissulaire de ces transcrits s’est avérée être différente de celle de la galectine-3 révélant ainsi une régulation indépendante des deux promoteurs (Guittaut et al., 2001). De plus, les transcrits issus de l’activité du promoteur interne présentent la particularité de posséder deux cadres ouverts de lecture (ORF) différents et chevauchants permettant la traduction de deux nouvelles protéines distinctes de la galectine-3 (figure 1). Ces résultats ont permis de définir une structure génique complexe dans laquelle un gène est emboîté dans celui de la galectine-3 humaine. Cet gène interne a été appelé galig pour : galectin-3 internal gene (Guittaut et al., 2001). Les deux nouvelles protéines, les galigines, exprimées dans des cellules eucaryotes en culture présentent des localisations cellulaires différentes, à l’origine de leur dénomination respective : la cytogaligine est localisée majoritairement dans le cytosol et le noyau alors que la mitogaligine est exclusivement localisée dans les mitochondries.
Mes travaux de thèse ont contribué à la mise en évidence du caractère cytotoxique de *galig* à l’origine de cette mort cellulaire génétiquement programmée. C’est pourquoi, dans la première partie de ce manuscrit nous allons "rentrer au cœur de la mort des cellules", et tenter de comprendre pourquoi ces processus de mort sont paradoxalement si importants pour la vie. Après quelques rappels historiques sur l’évolution des idées ayant conduit au concept de mort cellulaire programmée (MCP), nous décrirons les différentes formes et appellations de mort cellulaire ainsi que les principaux acteurs moléculaires impliqués dans la MCP. Enfin, nous montrerons que la mort cellulaire n’est pas un processus anarchique et délétère, mais bien un mécanisme ordonné et une fonction cellulaire vitale dont le dysfonctionnement peut entraîner de nombreuses pathologies pouvant conduire à la mort de l’organisme. La deuxième partie de ce manuscrit sera consacrée aux résultats obtenus lors de l’étude de la cytotoxicité de ce nouveau gène humain. Parmi les caractéristiques biochimiques qui accompagnent l’expression de *galig* dans les cellules humaines, la libération du cytochrome c a pu être reliée à une activité portée par la séquence d’adressage mitochondriale de la mitogaligine. Bien que certains des marqueurs classiques de la mort cellulaire par apoptose ne semblent pas impliqués dans la mort cellulaire induite par *galig*, nous avons cependant démontré qu’une protéine anti-apoptotique, Bcl-XL, inhibe la cytotoxicité du gène. Ainsi, ces résultats permettent de penser que *galig* induit une mort cellulaire alternative à l’apoptose.
GENERALITES
I. La mort cellulaire programmée : un concept récent.

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

![Figure 2 : Évolution du pourcentage et du nombre de publications contenant le terme "apoptosis" au cours des 40 dernières années.](image_url)

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

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

D'abord observée en 1842 par C. Vogt (Vogt., 1842), lors de la métamorphose du crapaud accoucheur (figure 3), il a été rapporté (Glucksmann, 1951) qu'une mort cellulaire "physiologique" se produit dans de nombreux tissus au cours du développement d'organismes vertébrés et invertébrés. Il n'était pas encore dans les esprits que la mort des cellules pouvait tenir un rôle aussi important que leur prolifération dans la construction d'un organisme.
Ainsi, l'idée que le développement, avant tout considéré comme genèse et non-destruction nécessitait des épisodes de mort cellulaire commença à faire son chemin. Ces événements considérés auparavant comme un défi au bon sens, commencèrent alors à ne plus apparaître comme anecdotiques et négligeables.

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

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

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

*Caenorhabditis elegans*, est un ver d’un millimètre de long, qui présente le double avantage de se développer rapidement et d’être translucide, ce qui permet de suivre directement au microscope les divisions des cellules.

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

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

Adapté de (Lockshin et Zakeri, 2001).
II. Pourquoi contrôler la mort cellulaire ?

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

❖ Contrôle de l'homéostasie cellulaire.

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

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

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

❖ Contrôle du développement.

Un organisme complexe ne peut se construire sans passer par des épisodes de "démolition". Dès les premiers jours qui suivent la fécondation, passé le stade de blastocyste, la mort cellulaire devient nécessaire au bon déroulement des étapes ultérieures du développement. Ce modelage permet d'ériger les structures et les formes spécifiques d'une espèce donnée. Chez l'Homme, la mort "sculpte" la forme des membres supérieurs (26 ème jour), inférieurs (27 ème jour), au 42 ème jour les mains sont encore en palette et éliminant les tissus séparant nos doigts, elle permet leur individualisation (figure 6) (Merino et al., 1999).
La mort permet également de faire disparaître les ébauches des organes génitaux du sexe opposé (Jacobson et al., 1997), elle est à l’origine de la chute des dents de lait et de la disparition du thymus etc..... La MCP permet une certaine plasticité nécessaire à l’adaptation des organismes et donc à la pérennité de l’espèce (Conlon et Raff, 1999). Cette plasticité est particulièrement évidente dans le développement du système nerveux central : 85% des neurones n’ayant pu établir de synapses dans le cerveau de l’embryon sont éliminés (Vaux et Korsmeyer, 1999).

Défense contre les infections ou les agressions physico-chimiques.

Une ambiguïté pourrait apparaître lors de l’utilisation du terme programmé, ce qui est "programmé" n’est pas uniquement le destin individuel de chaque cellule, mais aussi, sa capacité à déclencher son autodestruction de façon prématurée en réponse à différents stress : infections virales, irradiations, agents gênotoxiques, inhibiteurs de réplication.
La MCP participe ainsi, aux mécanismes de défense de l’organisme. Elle conduit à l’élimination des cellules modifiées et/ou infectées. Lors d’une infection virale, certaines cellules infectées vont mourir par MCP, limitant ainsi la réplication virale (Haecker et Vaux, 1994). Des signaux, à l’intérieur même de la cellule, peuvent traduire une atteinte de son intégrité et conduire à l’élimination des cellules endommagées par des agressions extérieures comme les UV, les produits chimiques et/ou anti-cancéreux ayant occasionné des dommages génétiques (Dyson et al., 1986; Searle et al., 1975 ).
Survie de la colonie chez les êtres unicellulaires.

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

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

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

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

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

La nécrose.

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

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

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

Dans ce cas, la cellule reçoit « l’ordre » de mourir, c’est à dire de mettre en route son programme d’autodestruction. Le *signal apoptotique* peut provenir de l’extérieur, à
savoir de l’environnement cellulaire (voie extrinsèque) ou bien de l’intérieur même de la cellule (voie intrinsèque).

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

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

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

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

Ce phénomène phylogéniquement très ancien, a pu être observé chez la moisissure *Dictyostelium discoideum*, le nématode *Caenorhabditis elegans* et aurait pu se développer avant même le processus apoptotique (Golstein et al., 2003; Lockshin et Zakeri, 2004a). L’autophagie est un processus physiologique constitutif, régulé et actif qui ne mène pas nécessairement à la mort de la cellule. Elle permet le renouvellement des organelles, des protéines, et le recyclage des constituants cellulaires lors des épisodes de carences nutritionnelles. Chez l’Homme adulte, elle contribue au maintien de l’homéostasie tissulaire lorsqu’une élimination massive de cellules est nécessaire : élimination des cellules sécrétoires en excès de la glande mammaire, des cellules prostatiques, de l’endomètre lors de l’atrophie de l’utérus après un accouchement (Bursch, 2001).

L’oncose.

C’est une forme passive ou accidentelle de mort cellulaire, qui se rapproche beaucoup de la nécrose, elle est même parfois appelée nécrose primaire (Lecoeur et al., 2001; Majno et Joris, 1995). Elle est caractérisée par un gonflement nucléaire et cytoplasmique, une vacuolisation du cytoplasme, un gonflement de la mitochondrie, mais surtout par la conservation de l’intégrité de la membrane plasmique, ce qui la différencie de la nécrose (Trump et al., 1997)
L’oncose implique toute une population de cellules, elle a été décrite lors d’accidents ischémiques, lors de chocs toxiques induits par des agents chimiques sur des cellules hépatiques ou rénales, mais ne semble pas intervenir au cours de développement. Au niveau moléculaire, un récepteur de surface a été associé à la mort cellulaire par oncose (Baehrecke, 2002). Ici la mort cellulaire va survenir d’une façon anormale, lors de l’épisode ischémique par exemple, mais se déroulera selon un processus normal prédéterminé (Van Cruchten et Van Den Broeck, 2002).

❖ **La paraptose.**

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

❖ **La sénescence.**

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

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

Pour Hayflick la sénescence cellulaire est *génétiquement programmée*, ce serait une différenciation terminale commandée par des gènes du vieillissement (gérontogènes) qui ne s’exprimeraient qu’à la fin de la vie. La cellule "n’oublierait" jamais son âge comme si elle possédait une horloge interne. En 1965, Leonard Hayflick met en culture des fibroblastes humains. Durant la phase I, dite de prolifération rapide, la culture se développe normalement en une mono-couche cellulaire confluente.
A la suite des repiquages, les cellules se divisent plus lentement (phase II), elles mettent plus de temps à atteindre la confluence. Puis, vers le 50ème repiquage, elles ne se divisent plus (phase III). Les cellules subissent un arrêt irréversible et permanent de leur cycle cellulaire, perdent leur pouvoir de transformation ou clonogénicité (Okada et Mak, 2004), donnent des signes de dégénérescence et meurent, c’est la **sénescence réplicative**. Ces cellules conservent l'intégrité de leur membrane plasmique, présentent des changements morphologiques tels qu’un cytoplasme aplati, une augmentation de granularité, des involutions au niveau de la chromatine, de l’ADN circulaire extra-chromosomique (Narita et al., 2003). La sénescence peut aussi être induite par un grand nombre de stress cellulaires. Les cellules ne présentent alors pas de raccourcissement des télomères mais ont le morphotype de cellules sénescentes (Campisi, 2001).

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

Le terme de "mitose catastrophique" a été inventé par Paul Nurse et Paul Russell pour décrire le funeste destin des cellules de *Schizosaccharomyces pombe* contraintes d’entrer en mitose suite à la sur-expression d’une molécule impliquée dans le cycle cellulaire appelée Cdc2, l’homologue chez les mammifères de CDK1 (Russell et Nurse, 1986). "La mitose catastrophique", définit un type de mort cellulaire identifié dans les cellules de mammifères présentant un nombre aberrant de mitoses. On observe des cellules géantes multinucléées contenant des chromosomes non condensés. Si une cellule est lésée ou si l’ADN est endommagé, des points de contrôle (check point) sont activés avant l’entrée en phase G2. Il y arrêt du cycle cellulaire le temps de la réparation, si la réparation est impossible, la cellule meurt par apoptose. Cependant, si le point de contrôle G2 est défectueux, la cellule entre en mitose prématurément avant que la réplication de l’ADN ne soit complète ou bien, avant que sa réparation ne soit terminée. Lorsque se profile cette mitose aberrante, la cellule meurt par "mitose catastrophique" (Okada et Mak, 2004). Des agents, induisant la dépolymérisation des microtubules et empêchant par conséquent la mise en place du fuseau mitotique, provoquent la mort de la cellule par mitose catastrophique. Ce processus de mort cellulaire apparaît être un mécanisme de réponse au stress hautement conservé, observé par exemple chez la drosophile. Des cellules mourrant selon ce procédé ont été décrites chez des patients atteints de la maladie d’Alzheimer et durant l’embryogenèse du poulet. Les bases moléculaires régulant ce procédé restent encore à déterminer, des preuves récentes mettent en avant le rôle cytoprotecteur de la molécule survivine (Okada et al., 2004).
### Tableau 1 : Caractéristiques des différents types de mort cellulaire.

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

<table>
<thead>
<tr>
<th>Type de Mort Cellulaire</th>
<th>Noyau</th>
<th>Membrane Cellulaire</th>
<th>Cytoplasme</th>
<th>Caractéristiques biochimiques</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td><strong>Apoptose</strong></td>
<td>Condensation de la chromatine. Fragmentation nucléaire ADN en échelle.</td>
<td>Bourgeonnement (blebbing)</td>
<td>Fragmentation et formation de corps apoptotiques</td>
<td>Dépendant des caspases Besoin d’ATP..</td>
</tr>
<tr>
<td><strong>Autophagie</strong></td>
<td>Condensation partielle de la chromatine Pas d’ADN en échelle</td>
<td>Bourgeonnement (blebbing)</td>
<td>Augmentation du nombre de vésicules dites autophagiques, des lysosomes, des mitochondries.</td>
<td>Indépendant des caspases. Augmentation de l’activité lysosomale</td>
</tr>
<tr>
<td><strong>Mitoses Catastrophiques</strong></td>
<td>Fragmentation nucléaire Multiples micro-noyaux</td>
<td>Nd</td>
<td>Nd</td>
<td>Indépendant des caspases (au stade précoce) Activation anormale de CDK1/cycline B</td>
</tr>
<tr>
<td><strong>Sénescence</strong></td>
<td>Structure hétérochromatique caractéristique.</td>
<td>Nd</td>
<td>Aplatissement Augmentation de la granularité</td>
<td>Activité β-galactosidase Indépendant des caspases.</td>
</tr>
<tr>
<td><strong>Paraptose</strong></td>
<td>Condensation partielle de la chromatine. Pas de fragmentation nucléaire. Pas d’ADN en échelle</td>
<td>Pas de bourgeonnement (blebbing)</td>
<td>Augmentation de la vacuolisation.</td>
<td>Pas d’inhibition par les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 Indépendant des caspases.</td>
</tr>
</tbody>
</table>
IV. Quelques acteurs moléculaires de la MCP.

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

![Diagramme de C. elegans](image1)

**Figure 9 : Les protéines engagées dans le programme de mort chez C.elegans.**
Adapté de (Youle, 2005) Inhibe, Active

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

![Diagramme de mammifères](image2)

**Figure 10 : Les protéines engagées dans le programme de mort chez les mammifères.**
Adapté (Youle, 2005) Inhibe, Active

- **Ced-3**, code pour une protéase à cystéine (**caspase**) homologue de l’enzyme ICE (*Interleukin-1 β Converting Enzyme,*caspase-1) effecteur de la cascade moléculaire (Miura *et al.*, 1993).

- **Ced-4**, protéine activatrice de Ced-3, a pour homologue mammalien la protéine **Apaf-1**.

- **Ced-9**, est un inhibiteur de Ced-4 (Hengartner et Horvitz, 1994). Sa contrepartie chez les mammifères correspond aux membres **anti-apoptotiques** de la **famille Bcl-2**.
La protéine Bcl-2 ou par extension les membres anti-apoptotiques préviennent la MCP (Hu et al., 1998). Cependant, à la différence de ce que l'on peut observer chez C.elegans, Apaf-1 et les protéines Bcl-2 n'interagissent pas directement.


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

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

1.1. **Caractéristiques structurales.**

Les protéines de la famille Bcl-2 ont été identifiées sur la base de la présence dans leur séquence d’au moins un domaine homologue à Bcl-2 (BH domain). Ces domaines conservés appelés domaines BH-1 à BH-4, pour « Bcl-2 Homology domain », s’organisent en hélice α (Adams et Cory, 1998). La présence de ces domaines BH est l’unité fondatrice de cette famille et permet d’y regrouper plusieurs protéines possédant au moins 1 domaine BH. Les protéines appartenant à cette famille ont des rôles antagonistes : les unes possèdent des propriétés prévenant la MCP (anti-apoptotiques), les autres des propriétés la promouvant (pro-apoptotiques) (Gross et al., 1999). En interagissant physiquement entre elles, ces protéines de la famille Bcl-2 sont capables de former des homo-et hétéro-dimères via leurs domaines BH. Ces interactions modulent très souvent les effets pro- et anti-apoptotiques observés. La distribution des domaines BH dans les...
protéines de la famille Bcl-2 et leurs propriétés anti- ou pro-apoptotiques de ces protéines ont permis une subdivision en trois sous-groupes (figure 11) :

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

- **Les protéines pro-apoptotiques** :
  - à multidomaines BH (Bax, Bak, Bok...). Les membres de cette famille contiennent les domaines BH1, BH2, BH3 (rarement BH4).
  - à domaines BH-3 seulement (Bid, Hrk, Bik, Bim, Bmf, Bad, Noxa, Puma...). Ces protéines ne contiennent que le domaine BH3.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Facteurs de survie, protéines anti-apoptotiques</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Famille Bcl-2 à multidomaines</td>
</tr>
<tr>
<td>Bcl-2, Mcl1, Bcl-w, Bcl-X_{L}</td>
</tr>
</tbody>
</table>

<table>
<thead>
<tr>
<th>Facteurs de Mort, protéines pro-apoptotiques</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Famille à multidomaines BH</td>
</tr>
<tr>
<td>Bax, Bak, Bok</td>
</tr>
<tr>
<td>Famille BH-3 seulement</td>
</tr>
<tr>
<td>Bid, Noxa, Bad</td>
</tr>
<tr>
<td>Bim, Puma, Bik</td>
</tr>
</tbody>
</table>

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

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

La réalité sur la diversité structurale des protéines de la famille Bcl-2 est plus complexe que cette classification ne pourrait le laisser croire. En effet, l’épissage alternatif des ARNm apparaît de plus en plus être une source importante de variabilité structurale et donc fonctionnelle de ces protéines. Ainsi, pour **Bid**, archétype de la protéine pro-apoptotique à domaine BH-3 seulement, 3 transcrits majeurs à l’origine de 3 isoformes ont été détectés : Bid(S), Bid(EL) et Bid(ES). Bid(S), l’isoforme la plus courte, est non
seulement dépourvue de domaine BH-3 mais en plus, elle antagonise l’effet pro-apoptotique de la forme activée de Bid (tBid) (Renshaw et al., 2004).

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

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

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

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

Vers 1890, Altman découvre dans les cellules des granules qui ressemblent à des bactéries et en 1897 Benda introduit le terme de mitochondrie (mitos : filaments, chondros : granules). La mitochondrie est le seul organite à disposer d’une double membrane (figure 12) délimitant deux compartiments sub-mitochondriaux : l’espace intermembranaire et la matrice. La membrane interne contient des complexes multi-enzymatiques répertoriés en trois grandes classes : les enzymes de la chaîne respiratoire, le complexe ATPase, des transporteurs spécifiques (figure 13). Ces endomembranes se caractérisent par la présence d’un phospholipide anionique spécifique des mitochondries, la cardiolipine. La membrane externe contient 3 % cardiolipine et la membrane interne a un taux supérieur à 20 %.

La mitochondrie est "les centrales et les réservoirs" d’énergie cellulaire, elles couplent la synthèse et le stockage de l’énergie sous forme d’ATP : "fournisseur universel d’énergie". Le métabolisme mitochondrial (cycle de Krebs) permet la production des cofacteurs réduits de type NADH+H⁺ et FADH₂, qui en étant ultérieurement réoxydés par la chaîne respiratoire permettront la synthèse d’ATP (figure 13) (phosphorylation oxydative).

Le transfert des électrons se fait par l’intermédiaire de 4 complexes multi-enzymatiques constitués de protéines spécifiques et de groupements prosthetiques fortement intégrés à la membrane interne à l’exception du cytochrome c. L’énergie d’oxydoréduction provenant du fonctionnement de la chaîne respiratoire est utilisée pour
la translocation active de protons H\(^+\) au travers de la membrane interne, depuis la matrice jusqu’au cytoplasme. Ce gradient de protons active l’ATPase, responsable de la synthèse d’ATP. Il participe également avec des transporteurs ioniques à l’établissement d’une différence de potentiel transmembranaire mitochondriale (\(\Delta \Psi \text{m}\)).

**Figure 13 : Chaîne respiratoire mitochondriale.**


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

Ces découvertes n’ont pas été acceptées instantanément par la communauté scientifique, car le modèle d’étude et de référence de la MCP, le ver *C.elegans*, n’avait pas montré son implication. De plus, il persistait la notion intuitive que les acteurs de la mort participaient uniquement à cette fonction, or la mitochondrie était connue pour jouer un rôle dans le “maintien en vie” de la cellule.
1.2.b. Les modèles de perméabilisation mitochondriale par les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2.

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

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

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

La structure de ce pore est peu caractérisée. Il serait enchâssé à la fois dans les membranes internes et externes des mitochondries en un endroit où les deux membranes sont apposées. Le PTP serait formé par l’association du translocateur nucléotidique à adénosine (ANT) exportant l’ATP en échange de l’ADP, localisé dans la membrane interne, du VDAC (canal anionique voltage dépendant) localisé dans la membrane externe, de la cyclophiline D (CypD) localisée dans la matrice, et peut-être d’autres protéines comme la créatine kinase, l’hexokinase, le récepteur des benzodiazépine (Crompton, 1999). L’ouverture du PTP peut être induite par l’accumulation de cations Ca²⁺ dans la matrice, le phosphate inorganique (Pi), les ROS, des variations de pH. Dans ce modèle, la chute du ΔΨm, le découplage des phosphorylations oxydatives n’apparaissent pas être nécessaires à l’exécution de la MCP (Zamzami et Kroemer, 2001) (figure 14 a).

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

- Alternativement Bax interagirait avec VDAC entrainant un changement conformationnel important, à l’origine de l’ouverture du pore, permettant la fuite d’effec teurs pro-apoptotiques.(Shimizu et al., 2000; Shimizu et al., 1999) (figure 14 b).
La taille du pore pourrait constituer une limite à ce modèle puisqu’il semblerait qu’il ne puisse laisser passer des effecteurs de masses supérieures à 1,5 kDa ce qui est, par exemple, incompatible avec une libération de cytochrome c.

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

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

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

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


**Modulation de canaux existants.**

- **a) Ouverture du PTP**
  - Eau, soluté

- **b) Canal Bax-VDAC**

**Formation de canaux.**

- **c) Pore lipidique ou complexe protéine-lipide**

- **d) Canal Bax**

- **e) Fission mitochondriale.**
  - Drp1 + Bax

**Figure 14 : Différents modèles proposés pour la libération mitochondriale du cytochrome c.**

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

**1.2.b.iii. Fission mitochondriale.**

La biogenèse des mitochondries est un phénomène complexe qui met en jeu le noyau et la mitochondrie elle-même. Les mitochondries se reproduisent par croissance à la suite de la synthèse coordonnée de ses constituants moléculaires.
A partir d’un certain volume mitochondrial, il y a coupure de la membrane interne, formation de deux vésicules matricielles et segmentation de la membrane externe. Ainsi des événements de fission participent à la morphologie et à la multiplication "naturelle" des mitochondries. Néanmoins, au cours de la MCP il a été observé une division des mitochondries en petits organites ponctiformes. La protéine Drp-1 (Dynamin-Related protein 1) participe à la scission de la membrane externe (figure 14 e). Cette protéine cytosolique peut se localiser en des sites préférentiels de la membrane mitochondriale lors de la mise en route de la MCP. La surexpression de Drp-1 est accompagnée d’une diminution de la re-capture intramitochondriale de Ca²⁺ (Szabadkai et al., 2004). L’inhibition de la fission ne permet pas, la formation d’organites ponctiformes, la chute du ΔΨm et la libération du cytochrome c, et bloque ainsi la MCP. Cela laisse penser que la fission mitochondriale pourrait intervenir dans la libération d’effecteurs de mort (Frank et al., 2001). Bax s’associerait à Drp-1 afin de fragmenter les mitochondries (Breckenridge et al., 2003; Karbowski et al., 2002).

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

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

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

1.3.a. Dimérisation/oligomérisation.

Les membres anti-apoptotiques sont quasiment toujours localisés dans les membranes, celle du RE, du noyau ou dans la membrane externe des mitochondries, et dans ces dernières, plus précisément en des sites de contact entre la membrane interne et externe (Krajewski et al., 1993; Nguyen et al., 1993). La dimérisation leur permet d’exercer leur fonction inhibitrice de la MCP. A noter qu’aucune oligomérisation n’est
requise à leur activité, comme cela est le cas pour les protéines pro-apoptotiques (Antonsson et al., 2000).

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

Les membres pro-apoptotiques sont pour la plupart présents dans le cytosol. La protéine Bax est localisée, sous une forme inactive et monomérique, dans le cytoplasme des cellules non-apoptotiques. Après la survenue d’un signal de mort, Bax subit un changement de conformation et se relocalise à la mitochondrie (Antonsson et al., 2001; Gross et al., 1998; Roucou et Martinou, 2001). Ces modifications conformationnelles permettent le démasquage d’une séquence d’adressage mitochondrial, et supposent donc que des domaines hydrophobes sont masqués, puis exposés de façon à promouvoir le ciblage et l’insertion membranaire de l’oligomère. Des variations de pH cytosolique peuvent induire le changement de conformation de Bax qui accompagne sa redistribution à la mitochondrie (Cartron et al., 2004c). Un mode d’activation identique est retrouvé chez son homologue fonctionnel Bak, déjà présent au sein des membranes mitochondriales. La formation d’oligomère est également essentielle à son activité (Mikhailov et al., 2003). La présence de tBid est nécessaire à l’oligomérisation des protéines Bax et Bak (Roucou et al., 2002; Ruffolo et Shore, 2003; Wei et al., 2000) (figure 15). La nature du ou des domaines de Bax permettant son interaction avec Bid restait jusque récemment inconnu. Il semble désormais que ce soit l’hélice α1 de Bax qui permette une interaction avec le domaine BH-3 de Bid (Cartron et al., 2004a).

Par ailleurs, il a été montré que Bcl-2 et Bax sont capables de s’hétérodimériser par l’intermédiaire des domaines BH (Yin et al., 1994). La surexpression de Bax inhibe les propriétés anti-apoptotiques des protéines de la famille Bcl-2, ceci suggère une
régulation au travers d’interaction protéine/protéine entre les membres pro- et anti-apoptotiques.

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

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

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

1.3.b. Clivage.

Le clivage de Bax (forme p21Bax) par la calpaine ou la cathepsine-D génère la forme p18Bax détéleée des 33 premiers aa en N-terminale (Wood et Newcomb, 1999). Cette forme tronquée de Bax augmente les propriétés apoptogènes de Bax (Cao et al., 2003; Toyota et al., 2003). Pourtant p18Bax ne contient plus le domaine ART (apoptosis-regulating targeting sequence) (Goping et al., 1998) contenant le signal d’adressage mitochondrial de p21Bax (Cartron et al., 2003). Ce signal, important pour la translocation mitochondriale de Bax durant la phase exécutrice de l’apoptose, est contenu dans l’hélice α1. Ces données semblaient contradictoires, il semble en fait que p18Bax entre en
compétition avec p21\textsuperscript{Bax} pour interagir avec les membres anti-apoptotiques, favorisant ainsi l’activité apoptotique de Bax à la mitochondrie.

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

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

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

1.3.c. Phosphorylation.

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

Un traitement de cellules au Taxol ou avec d’autres drogues affectant l’intégrité des microtubules, induit la phosphorylation d’une sérine de Bcl-2, et inhibe sa fonction anti-apoptotique (Haldar \textit{et al.}, 1995). Bcl-X\textsubscript{L} est aussi phosphorylée après la dépolymérisation des microtubules. Raf1 pourrait être la sérine/thréonine kinase responsable de la phosphorylation de Bcl-2 puisqu’il a pu être démontré qu’elles interagissaient dans la membrane mitochondriale. Il est supposé que la perte de fonction anti-apoptotique soit en partie due à la perte de capacité de Bcl-2 de se lier à Bax. En revanche, la phosphorylation de Bcl-2 sur Ser 70 semble nécessaire pour son action anti-apoptotique. Les conséquences fonctionnelles de la phosphorylation de Bcl-2 sont
davantage basées sur l’arrêt de la mitose plutôt que sur l’induction de la MCP (Scatena et al., 1998).
2. La libération extra-mitochondriale de facteurs pro-apoptotiques : armes fatales !

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

2.1. Cytochrome c.

Sous l'action de divers stimuli pro-apoptotiques, le cytochrome c mitochondrial est libéré dans le cytosol (Liu et al., 1996). En se liant à Apaf-1 (Apoptosis protease activating factor-1) ce cytochrome c ectopique provoque notamment l'activation d'une cascade de protéases (les caspases) conduisant à la destruction protéolytique de la cellule. Le cytochrome c peut également interagir avec le récepteur InsP3 du réticulum endoplasmique et provoquer ainsi une vague de calcium cytosolique délétère pour la cellule (Boehning et al., 2003). Le cytochrome c est libéré de manière soudaine, rapide et totale indépendamment de l'intensité du signal apoptotique et de la température (Goldstein et al., 2000). Ces résultats montrent que la libération du cytochrome c suit une loi de “tout ou rien” et que ce phénomène est indépendant d’un système de transport enzymatique. La libération de tout un cocktail de protéines séquestrées dans l’espace intermembranaire indique que ce mécanisme de fuite n’est pas spécifique du cytochrome c. La dissipation du ΔΨm accompagne la libération du cytochrome c mais, cette dépolarisation mitochondriale n’est ni nécessaire ni une conséquence directe du relargage du cytochrome c (Bossy-Wetzel et al., 1998). Par ailleurs, il a également été démontré que la cellule parvenait à conserver un ΔΨm après la diffusion du cytochrome c même en présence d’oligomycine (inhibiteur de l’ATPase) (Goldstein et al., 2000).
Par conséquent une quantité résiduelle de cytochrome c est présente dans la mitochondrie. Soit ce cytochrome c correspond à un stock non libérable, soit ce cytochrome c a été re-capté dans l'espace intermembranaire, afin de participer au transport des électrons, ce dernier phénomène ayant déjà été observé in vitro (Kluck et al., 1999). Le maintien du $\Delta \Psi m$ et donc de la production d'ATP serait nécessaire à la formation de l'apoptosome (complexe cyt c/Apaf-1/pro-caspase-9/dATP) après la libération de cytochrome c.

2.2. AIF.

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

2.3. Endonucléase G.

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

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

2.5. HtrA2/Omi.

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

L’oxygène de l’air que nous respirons, nécessaire pour produire de l’énergie, subit une réduction conduisant à la production d’eau. Cette réaction est catalysée par la cytochrome oxydase, présente dans le complexe IV de la chaîne de transport des électrons, (figure 13), et conduit aux intermédiaires $\text{O}_2^-$, $\text{H}_2\text{O}_2$ et $\cdot\text{OH}$. Ces intermédiaires sont appelés espèces réactives de l’oxygène (ROS) car ils présentent une réactivité beaucoup plus importante que l’oxygène dont ils dérivent. Les mitochondries sont la principale source endogène de production de ROS, mais également leur cible durant la MCP. Les phénomènes de stress oxydant ont pour origine un dysfonctionnement des systèmes enzymatiques de régulation du métabolisme de l’oxygène (superoxyde dismutase, catalase et glutathion peroxydase). Les radicaux hydroxyles sont des oxydants puissants, les plus dommageables du stress oxydant en raison de leur extrême réactivité, ils "attaquent" tous les matériaux biologiques : ADN, lipides, protéines. Les mitochondries sont donc continuellement exposées aux ROS susceptibles de causer la péroxydation des lipides membranaires, le clivage de l’ADNm et le blocage de la production d’ATP, autant de stress cellulaires induisant la MCP (Huang et al., 1999). Les ROS peuvent être à l’origine du déclenchement de l’apoptose ou participer à l’amplification du signal apoptotique :

- Un stress oxydant génère la formation de $\text{H}_2\text{O}_2$, ce qui induit une diminution de la production d’ATP, l’ouverture du PTP et la libération d’effecteur de l’apoptose tel que le cytochrome c (Tiwari et al., 2002). L’observation que la surexpression de la superoxyde dismutase mitochondriale (Mn-SOD) peut bloquer l’apoptose a conforté le fait que les ROS peuvent induire la MCP.(Nomura et al., 1999).

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

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


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

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

![Figure 17 : Structure des caspases de mammifères.](image)

QAC\text{XG} constitue le site actif des caspases. Asp-X correspond aux sites de clivage conduisant à l’activation de la caspase. Adapté de (Couzinet *et al.*, 2002).

Le pro-domaine N-terminal de taille variable est à l’origine d’un mode d’activation particulier qui a permis une classification des caspases. Ainsi, on distingue :
- **Les caspases à pro-dominate long** sont dites **initiatrices**. Elles contiennent des motifs d’interaction protéine-protéine et sont impliquées dans l’initiation du signal de mort. Pour les caspases 8 et 10, les domaines DED (*Death Effector Domain*) sont des structures qui permettent la liaison de la caspase à des molécules adaptatrices. Pour les caspases 1, 2, 4 et 9, les domaines CARD (*Caspase Recruitement Domain*) jouent un rôle dans l’interaction entre caspases ainsi qu’avec une grande variété de molécules adaptatrices ou régulatrices. Ces motifs d’interaction permettent un recrutement des caspases au sein de complexes protéiques de signalisation et une auto-activation.

- **Les caspases à pro-dominate court** (caspases 3, 6, 7, 14) sont dites **exécutrices**. Elles sont impliquées dans la transduction du signal de mort et sont responsables de l’autodestruction de la cellule durant la phase effectrice. Elles ne possèdent pas de domaine leur permettant d’être recrutées et de s’oligomériser. Les caspases sont donc constituées de protéines initiatrices et effectrices, aboutissant à un fonctionnement dit en cascade (Thornberry et Lazebnik, 1998; Wolf et Green, 1999).

### 3.2. Modes d’activation des caspases.

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

**Figure 18 : Mécanisme d’activation des caspases.**

Adapté de (Couzin et al., 2002)
Cette protéolyse se fait de manière séquentielle, une première coupure a lieu entre la grande sous-unité p20, et la petite p10 (figure 17), puis une seconde coupure libère le pro-domaine de la grande sous-unité (figure 18). La caspase va pouvoir s’assembler sous sa forme active. L’enzyme mature est un tétramère composé de 2 hétérodimères eux-mêmes issus de l’association de 2 sous-unités (p20/p10) et possède donc deux sites actifs (Walker et al., 1994). Tous les sites de maturation sont de type Asp-X, et peuvent donc être reconnus par les caspases. Les mécanismes d’activation des caspases doivent être extrêmement régulés compte tenu des conséquences qui pourraient résulter d’une activation inopinée des ces protéases, à savoir la mort cellulaire (Kumar, 1999)

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

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

Les mammifères ont développé une voie de MCP impliquant la famille du récepteur au TNF (Ashkenazi et Dixit, 1998). La fixation du ligand (Fas ligand, TNF) à un récepteur (Fas/Apo-1/CD95, TNF-R1) présent à la surface des cellules induit l’homotrimérisation du complexe ligand/récepteur (figure 19). Ces récepteurs transmembranaires possèdent dans leur portion intracellulaire une région conservée appelée le « domaine de mort » (DD : death domain).
Ces domaines intracellulaires deviennent alors capables de recruter, grâce à des protéines adaptatrices (FADD, TRADD..) (Boldin et al., 1996; Muzio et al., 1996) et par l'intermédiaire des DED, plusieurs molécules de pro-caspase-8. Le complexe multiprotéique ainsi formé à la membrane a été appelé le **DISC** (*Death Inducing Signaling Complex*) et génère une grande concentration locale en zymogène (Krammer, 2000). Il semble que le rapprochement des pro-caspases-8 dans le DISC provoque un changement conformationnel permettant leur clivage réciproque, et ce malgré la faible activité intrinsèque des pro-caspases. Les pro-enzymes s’auto-activent mutuellement ce qui permet la libération des formes actives de la caspase-8 dans le cytosol, lesquelles activeront, également par clivage, d’autres caspases effectrices (Ashkenazi et Dixit, 1998; Kischkel et al., 1995).

Ce type d'activation est particulièrement important dans le système immunitaire (Yeh et al., 1999). L'expression du ligand Fas est restreinte aux lymphocytes T cytotoxiques (LTc) et Natural Killer (NK) activées (figure 20).
Le LTc peut induire l'apoptose d'une cellule cible par la liaison de Fas à son ligand, cela a pu être étudié dans au moins trois cas bien caractérisés :

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

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

L'activation auto-protéolytique de la pro-caspase-9 est induite par la formation d'un complexe associant : dATP, Apaf-1 (homologue de l'activateur Ced-4), cytochrome c, et procaspase-9 (homologue de Ced-3) (Budihardjo et al., 1999; Li et al., 1997 ; Liu et al., 1996 ).
Apaf-1 est une protéine adaptatrice, elle s’associe avec la pro-caspase-9 par l’intermédiaire du domaine CARD, présent dans les deux protéines, et avec le cytochrome c grâce à la présence de son domaine « WD rich ».

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

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

3.3. Les substrats des caspases.

Une fois activées, les caspases sont donc capables de se cliver entre elles, ce qui permet une amplification du signal de mort. La caspase-3 peut cliver les caspases 2, 6, 8 et aussi 9, la caspase9 active les caspases-3 et 7, la caspase-8 active les caspases 3, 6, et 7. Cependant, les caspases ont d’autres substrats, une centaine de protéines impliquées dans différentes fonctions cellulaires ont été identifiée. Cela a permis de comprendre certains des changements morphologiques observables lors de l’apoptose. Nous allons citer quelques-unes unes de ces protéines cibles :

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

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

Les photos A et B de cellules en apoptose, illustrent les phénomènes de condensation chromatiniene et de bourgeonnements nucléaires.
A la différence de l’apoptose, la paraptose s’accompagne d’une absence de fragmentation inter-nucléosomale de l’ADN malgré une condensation de la chromatine. Lors de la mort cellulaire autophagique, les dommages nucléaires sont toujours précédés de la dégradation du contenu cytoplasmique.

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

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

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

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

- Des protéines impliquées dans les voies de transduction, dans l’expression des gènes, dans la régulation du cycle cellulaire, la prolifération etc.... (Earnshaw et al., 1999)
3.4. Les inhibiteurs des caspases: antidotes de la mort !

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


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

- Les inhibiteurs viraux :

  **CrmA**, protéine du virus de la vaccine, a un effet inhibiteur sur l’inflammation (Palumbo *et al.*, 1994), sa surexpression permet d’inhiber la mort induite par la privation en
facteur de croissance, Fas ligand ou le TNF (Gagliardini et al., 1994 ; Tewari et al., 1995), et elle inhibe l'activité protéolytique des caspases 1, 8.

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

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

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

Les protéines E8 issue du virus équin de l’herpes de type II, MC159 et MC160 toutes deux issues du virus Molluscum contagiosum utilisent une stratégie similaire à celle de FLIP afin d'inhiber la mort. Elles se lient aux pro-domaines des caspases-8 ou -10 et empêchent leur recrutement aux récepteurs de mort (Duckett et al., 1996 ; Uren et al., 1996).
Figure 24 : Implication de différents acteurs moléculaires dans la voie des récepteurs de mort et dans la voie mitochondriale de la MCP.

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

- Les inhibiteurs synthétiques.

3.5. Une voie de MCP indépendante des caspases.

3.5.a. Des preuves de son existence.

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

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

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

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

Le noyau a une forme irrégulière, il est partiellement condensé, le RE est dilaté, la cellule se condense, un bourgeonnement apparaît à la surface et les cellules ainsi traitées ne peuvent être sauëves de la mort. Ces observations laissent sous-entendre que certains des marqueurs cytoplasmiques de l'apoptose peuvent être déclenchés par d'autres enzymes que les caspases à la différence des événements nucléaires qui nécessitent l'activité des caspases (Kitanaka et Kuchino, 1999). Par conséquent, les inhibiteurs de
caspase ne préviennent pas la libération cytosolique de cytochrome c, mais empêchent l’activation de la caspase-3 et la fragmentation nucléaire. Ils ne font qu’accorder un délai supplémentaire de vie à la cellule et en aucun cas ne peuvent contrarier à long terme la cytotoxicité induite par Bax. Ainsi, Bax et les membres de la famille Bax peuvent induire la mort des cellules par une voie indépendante des caspases (Rosse et al., 1998).

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

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

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

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

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

![Figure 25 : Voie de mort cellulaire indépendante des caspases chez C. elegans.](image)
dans le matériel cellulaire assurant la mort. Les embryons semblent bien équipés pour garantir si besoin la mort des cellules par des voies alternatives.

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

3.5.c. Des candidats pour la servir.

Si une voie indépendante des caspases est une des stratégies de la cellule pour mourir, quels sont alors les candidats impliqués dans cette voie ? et comment en l’absence des caspases obtient-on le déclenchement puis à terme la mort de la cellule?

Les expériences réalisées avec le zVAD-fmk ont permis de constater que cet inhibiteur ne prévient pas la mort et ne bloque pas non plus les manifestations qui surviennent au niveau de la mitochondrie. Ainsi, la chute du ΔΨm, la production de ROS ou encore la libération extra-mitochondriale des effecteurs de la mort comme le cytochrome c et l’AIF sont toujours observés lors de l’inhibition de l’activité des caspases. Cette voie indépendante des caspases pourrait donc mettre à contribution la mitochondrie pour arriver à ses fins, à savoir la mort de la cellule.

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

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

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

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

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

Mais d’autres résultats suggèrent que cette libération soit clairement indépendante de celle du cytochrome c et indépendante des caspases (Daugas et al., 2000 ; Susin et al., 1999). Dans cette optique, l’AIF peut être parfois libéré de façon dépendante des caspases, mais souvent de façon indépendante, ce qui suppose l’existence de plusieurs mécanismes permettant la libération mitochondriale de l’AIF et d’autres protéases de l’espace intermembranaire (Cande et al., 2004).
Lorsque les caspases interviennent dans la voie de transduction du signal de mort, elles interviennent en amont de la mitochondrie, et par conséquent de l'AIF : sa libération serait caspase-dépendante.

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

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

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

4.1. Causes d’une augmentation de [Ca\(^{2+}\)]\(_c\) dans la MCP.

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

- Les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak peuvent s’insérer dans les membranes du RE générant une fuite de Ca\(^{2+}\) (Nutt et al., 2002 ; Scorrano et al., 2003).
- La caspase-8, activée par exemple par la protéine Fas, peut cliver une protéine transmembranaire du RE : la protéine BAP31 (Bcl-2 associated protein 31) (Annaert et al., 1997). Le clivage de BAP31 par la caspase-8 génère un fragment p20 également à l’origine d’une fuite de Ca\(^{2+}\) (Breckenridge et al., 2003).
- En plus de la formation de l’apoptosome, le cytochrome \(c\) libéré pourrait agir sur le récepteur de l’InsP\(_3\) localisé à la membrane du RE provoquant une libération de Ca\(^{2+}\) (figure 28) (Furuichi et al., 1989).

4.2. Conséquences d’une augmentation de [Ca\(^{2+}\)]\(_c\) dans la MCP.

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

- La re-capture massive du Ca\(^{2+}\) par les mitochondries provoque une dépolarisation de la membrane mitochondriale, un arrêt des synthèses d’ATP et l’ouverture du PTP (Bernardi, 1999 ; Boehning et al., 2003).
- Le recrutement à la mitochondrie de la protéine Drp-1 génère une fission mitochondrial (Breckenridge et al., 2003). Cette fission mitochondriale s’accompagne d’une libération de cytochrome \(c\) (Jimbo et al., 2003).
L’activation d’endonucléases Ca\textsuperscript{2+} dépendante (Wyllie, 1980). En plus de CAD, il semblerait que d’autres nucléases puissent être spécifiquement activées par le Ca\textsuperscript{2+} au cours de l’apoptose (Kawane et al., 2001).

L’activation de la calcineurine qui est une phosphatase dépendante du Ca\textsuperscript{2+} et de la calmoduline. L’activation de la calcineurine provoque la déphosphorylation de Bad (protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2) qui est alors transloquée du cytosol vers la mitochondrie où elle stimule la libération de cytochrome c (Wang et al., 1999).

L’activation de la phospholipase A2 (PLA2) par le Ca\textsuperscript{2+} produit de l’acide arachidonique dont l’accumulation pourrait modifier la perméabilité membranaire mitochondriale (Gugliucci et al., 2002; Obeid et al., 1993).

L’activation de cystéine protéases cytosoliques Ca\textsuperscript{2+}-dépendante de type calpaïnes (Suzuki et al., 1987). La m-calpaïne (ou calpaïne II) activée par le Ca\textsuperscript{2+} est transloquée vers le RE où elle active par clivage protéolytique de la caspase-12 (Nakagawa et Yuan, 2000). Cette cascade n’a pas été décrite chez l’homme puisque la caspase-12 y est non fonctionnelle (Fischer et al., 2002).

Le calcium cytosolique peut induire une activité de type caspase-3 à l’origine d’effets apoptotique nucléaires (Juin et al., 1998).

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

Un stimulus de mort (ex : activation des récepteurs de mort) induit la libération mitochondriale du cyt c (a) qui diffuse vers le RE, se lie au récepteur InsP\textsubscript{3} (b) et induit la libération du Ca\textsuperscript{2+} à partir du RE (c). Le Ca\textsuperscript{2+} relargué du RE provoque une augmentation rapide de la [Ca\textsuperscript{2+}] cytosolique (d) lequel est capté par les mitochondries, ce qui amplifie le relargage de cyt c à partir des mitochondries (e).

Le cyt c cytosolique permet également la formation de l’apoptosome (f) qui conduira à une cascade d’activation de caspases, et de nucléases qui finaliseront le processus de mort cellulaire en clivant des protéines et l’ADN (g). InsP\textsubscript{3} : Inositol 1,4,5, triphosphate cytochrome c : cyt c. Adapté de (Mattson et Chan, 2003).
5. Phosphatidylsérine : mangez moi !

Pour que les corps apoptotiques soient reconnus comme des éléments à phagocyter, la cellule doit pouvoir se différencier des cellules avoisinantes et signaler son état apoptotique. Pour ce faire, la membrane plasmique se réorganise et exhibe des signaux de mort pro-phagocytaires, dit signaux « eat-me ». Un signal clairement établi est l’exposition des résidus phosphatidylsérine (PS) à la surface cellulaire, événement précoce des programmes de mort cellulaire. La membrane plasmique est constituée d’une double couche lipidique asymétrique, les 2 demi-couches ont des compositions différentes. Le cholestérol semble se répartir de manière équivalente sur les deux demi-couches, les glycolipides sont strictement retrouvés sur le feuillet externe de la membrane et enfin la composition en phospholipides diffèrent selon leur nature : la phosphatidylcholine se trouve plus facilement sur le feuillet externe, et la phosphatidylsérine préférentiellement sur feuillet interne (Fadok et al., 1998; Fadok et al., 1992; Schlegel et Williamson, 2001). L’aminophospholipide translocase est normalement responsable de cette distribution asymétrique de la PS et la scramblase est capable d’homogénéiser la distribution des phospholipides entre les deux feuillets. Ainsi, le changement de localisation des molécules de PS, au cours du processus apoptotique, qui passent d’une orientation cytoplasmique à une orientation extracellulaire est le résultat de l’activité de ces 2 enzymes. L’aminophospholipide translocase est inhibée et la scramblase est activée (Schlegel et al., 1996; Zwaal et Schroit, 1997). Il est intéressant de noter que l’activité de la scramblase dépend du Ca²⁺ alors que l’activité de l’aminophospholipide translocase est inhibée par le Ca²⁺ (Orrenius et al., 2003). Enfin l’activité de l’aminophospholipide translocase dépend de l’ATP contrairement à celle de la scramblase (Balasubramanian et Schroit, 2003). Par ailleurs, si la cellule apoptotique se distingue de la population de cellules saines, il faut que les phagocytes "professionnels" de l’enlèvement des cadavres soient à même de reconnaître cette cellule condamnée. Il a été établi que les macrophages reconnaissaient d’une manière très efficace les résidus PS par l’intermédiaire d’un récepteur stéréospécifique (Fadok et al., 2000).

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

V. Mort cellulaire et pathologies.

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

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

<table>
<thead>
<tr>
<th>PATHOLOGIES</th>
<th>EXEMPLÉS</th>
<th>MORT CELLULAIRE</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Maladies neurodégénératives</td>
<td>Alzheimer</td>
<td>+</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Sclérose latérale amyotrophique</td>
<td>+</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Parkinson</td>
<td>+</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Chorée de Huntington</td>
<td>+</td>
</tr>
<tr>
<td>Désordres immunitaires</td>
<td>Maladies autoimmunes</td>
<td>-</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>SIDA</td>
<td>+</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Diabète</td>
<td>+</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Thyroïdite</td>
<td>+</td>
</tr>
<tr>
<td>Néoplasies</td>
<td>Lymphome</td>
<td>-</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Astrocytome</td>
<td>-</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Hépatome</td>
<td>-</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Mélanome</td>
<td>-</td>
</tr>
<tr>
<td>Divers</td>
<td>Rejet de Greffe</td>
<td>-</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Hépatites fulminantes virales</td>
<td>+</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Chocs toxî-infectieux</td>
<td>+</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Accidents Vasculaires Cérébraux</td>
<td>+</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Deux types de dysfonctionnement peuvent être distingués :

- Ceux qui conduisent à une inhibition de la mort cellulaire programmée. Ils permettent l’apparition de cellules néoplasiques, et contribuent au développement d’incidents prolifératifs tel que les cancers (Thornberry et Lazebnik, 1998).
- Ceux qui génèrent un excès de mort cellulaire programmée. Ils sont responsables de dommages dans des tissus sains, et peuvent contribuer à l’apparition de pathologies de type dégénérative.
Enfin, sans qu’un dysfonctionnement de la MCP ne soit directement à leur origine, il existe un certain nombre de pathologies dans lesquelles un stress "primaire" (infection virale ou bactérienne, épisode hypoxique...) engendre une activation des voies d’exécution de la MCP provoquant l’endommagement des tissus. C’est le cas au cours d’un choc septique, ou pour les cellules cardiaques lors d’un infarctus du myocarde, ou pour des cellules nerveuses lors d’un accident vasculaire cérébral. Dans ces exemples beaucoup de cellules meurent par nécrose, et d’autres meurent par apoptose.

1. Le cancer.

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

1.1. Cancer et apoptose.

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

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

- **La surproduction ou de l’activation constitutive de protéines anti-apoptotiques.**

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

Des expériences *in vivo* montrent la nécessité d’une surexpression de l’oncogène myc, Bcl-2 et myc agissant en synergie pour induire une transformation maligne (Strasser *et al.*, 1990).
**c-IAP2** : c-IAP2 appartient à la famille des protéines inhibitrices de l’apoptose qui inactivent les caspases. La translocation chromosomique t (11;18) (q21;q21) génère des transcrits fusionnés entre c-IAP2 (en 11q21) et MALT1/MLT (*Mucosa Associated Lymphoid Tissue Lymphoma Translocation gene 1*) (en 18q21) (Uren et al., 2000). La protéine chimère résultant de cette translocation active NF-κB qui contribue à l’induction du gène c-IAP-2 amplifiant ainsi l’effet anti-apoptotique. Ces lymphomes du MALT se développent dans les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses.

![Diagramme](image)

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

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

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

**Bax** : Des formes mutées de Bax par décalage du cadre de lecture (ajout ou délétion d’une désoxyguanine dans l’exon 3 du gène) sont retrouvées dans plus de la moitié des cancers gastro-intestinaux, du moins ceux chez qui s’accompagnent une instabilité des microsatellites (Rampino et al., 1997), et dans la plupart des lymphomes à instabilité microsatellitaire (Inoue et al., 2000).
BaxΨ est une forme restreinte aux tumeurs d’origine gliale (24% des tumeurs) présentant une délétion dans la région N-terminale par rapport à la forme principale Baxα. BaxΨ est localisé à la mitochondrie et semble posséder un pouvoir pro-apoptotique supérieur à Baxα. La présence de BaxΨ est corrélée avec une augmentation de la survie des patients atteints de glioblastomes multiformes (Cartron et al., 2002).

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

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

♂ **L’inactivation de protéines contrôlant l’expression de gènes de la MCP.**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3. Les maladies dégénératives.

Dans ce type de maladie, des niveaux importants de morts cellulaires sont observés (Anglade et al., 1997). Chez la drosophile, dans un modèle de dégénérescence rétinienne, l’utilisation d’un inhibiteur viral des caspases a pu prévenir la perte de cellules nerveuses de la rétine et conserver la vision (Davidson et Steller, 1998). Ce résultat est important car cette maladie, qui, à terme aboutit à la cécité ressemble beaucoup à celle rencontrée chez l’homme (maladie génétique retinitis pigmentosa). Par contre, toujours chez la drosophile, dans un modèle de la Chorée de Huntington, le même inhibiteur de caspase n’a pu empêcher la mort des cellules nerveuses (Jackson et al., 1998). Dans cette maladie, le gène muté n’est pas impliqué directement dans le contrôle de la mort cellulaire, mais les neurones du striatum puis du cortex cérébral meurent par apoptose. La partie codante du gène de la protéine Huntingtine présente une expansion d’un motif répété (CAG)n d’où un motif polyGLN. La protéine mutée Huntingtine présenterait une affinité réduite pour un partenaire cytoplasmique (Hip-1). Cela permettrait à Hip-1 de former un complexe avec une autre protéine cytoplasmique (Hippi). Ce complexe déclencherait l’activation de la caspase-8, et donc de la cascade des caspases (Gervais et al., 2002). C’est parce que cette pathologie touche une voie dépendante des caspases que l’on teste des inhibiteurs, et ainsi la maladie semble pouvoir être quelque peu ralentie (Chen et al., 2000).
RESULTATS
Galig, un nouveau gène humain emboîté dans le gène de la galectine-3 humaine, possède deux phases ouvertes de lecture traduites en deux protéines différentes de la galectine-3.

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

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

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

Le locus du gène de la galectine-3 illustre bien ce concept de structure génique complexe. Un second promoteur se trouve localisé dans l'intron 2 du gène (Raimond et al., 1995) (figures 1 et 30). Ce promoteur interne (Pr.2) possède une activité promotrice plus faible que celle du promoteur proximal (Pr.1) mais est néanmoins capable de transcrire des ARNm différents de ceux produits par le promoteur principal (Pr.1). Deux transcripts, une forme longue et une forme courte, issus de Pr.2 ont été détectés par RT-PCR dans différentes lignées cellulaires. Le séquençage a précisé que le "grand" ARNm présente son site d'initiation de transcription dans le second intron de la galectine-3 et s'étend de l'exon 3 à l'exon 6.
Le "petit" ARNm présente une délétion, par rapport au transcrit de plus grande taille, entre les nucléotides 95 et 389. Ces sites correspondent à des sites consensus donneur et accepteur d'épissage, indiquant la possibilité d'un épissage alternatif à l'intérieur de cet ARNm.

![Figure 30 : Représentation schématique du gène de la galectine-3 et détection des transcrits issus du promoteur interne par RT-PCR.](Image)

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

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

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

Des vecteurs d'expression mettant en phase chacune des ORFs avec le gène reporteur de EGFP ont démontré, lors d'expériences de transfection transitoire, que l'ARNm pouvait produire les deux protéines codées par les ORFs 1 et 2 (Guittaut et al., 2001). L'observation des cellules transfectées, parmicroscopie de fluorescence, a permis de déterminer la localisation des protéines issues de l'expression des deux ORFs. La fluorescence associée à l'expression du plasmide pORF1-EGFP est plus ou moins diffuse et majoritairement cytosolique et nucléaire.
A l'inverse la fluorescence associée à l'expression du plasmide p ORF2-EGFP est clairement associée aux mitochondries et totalement exclue du noyau.

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

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

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

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

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

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

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

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

3. Expression tissulaire différentielle des transcrits du gène galig.

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

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

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

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


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

*Figure 34 : Morphologie des cellules exprimant galig.*


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

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

- Quels peuvent être les mécanismes et les médiateurs moléculaires qui gouvernent la toxicité induite par le gène *galig* ?
- Le processus de mort induit par *galig* est-il dépendant ou indépendant des caspases ? Requiert-il ou engage-t-il des protéines de la famille Bcl-2 ?
- De nombreuses voies moléculaires convergent vers la mitochondrie, est-ce que le mode d’action du gène *galig* implique lui aussi la mitochondrie ?

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

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

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

Mélanie Duneau, Michaël Boyer-Guittaut, Patrick Gonzalez, Stéphane Charpentier, Thierry Normand, Martine Dubois, Jacques Raimond et Alain Legrand.
RESULTATS. Chapitre 1 Galig inducteur de la mort cellulaire.

II. Galig et mort cellulaire programmée.

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

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

1. Modifications de la membrane plasmique.

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

Les cellules HeLa ont été transfectées de façon transitoire par les vecteurs d’expression eucaryote pORF2-EGFP codant la mitogaligine-EGFP et la cytgaligine ou pEGFP N3 codant EGFP.
Les cellules ont été incubées 24 heures après la transfection avec l’Annexin-V-Alexa 568 suivant le protocole établi par Roche Diagnostics (Roche Molecular Biochemicals Mannheim, Allemagne) puis observées en microscopie de fluorescence. La figure 4 B de l’article (chapitre 1, I) rend compte d’un marquage positif pour l’annexine V des cellules exprimant *galig*. Il convient de noter que les cellules positives se trouvent à un stade avancé dans le programme de mort puisqu’elles ont perdu les caractéristiques morphologiques de leurs origines tissulaires (absence de ramifications), elles sont arrondies et présentent une réduction importante de leur volume cellulaire. Ces cellules sont prêtes à se décrocher de la boîte de culture. L’expression de *galig* induit une translocation de la PS ce qui traduit une perte de l’asymétrie membranaire. Cependant, les cellules paraissent conserver l’intégrité de leur membrane plasmique lors de ce phénomène puisque des expériences révèlent que le colorant bleu trypan ne pénètre pas dans les cellules exprimant *galig* (non montré).

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

1.1. Matériel et méthodes.

1.1.a. Culture cellulaire.

Les cellules HeLa sont cultivées à 37°C en atmosphère humide à 5% de CO2 dans un milieu MEM 1X (Gibco BRL Life Technologies Inc., Rockville, MD, Minimum Essential Medium, NaHCO3 0.2%, L-alanyl-glutamine 2 mM, pénicilline 100 u/ml, streptomycine 100 µg/ml, pyruvate de sodium 1 mM, acides aminés non-essentiels 1 mM et SVF 10%). Les cellules HeLa sont mises en culture dans des boîtes 24 puits à raison de $4 \times 10^4$ cellules par puits, 24 heures avant la transfection.
1.1.b. Transfection transitoire.

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

► Préparation du complexe : 50 µl de solution d’ADN (NaCl 9 %o : 40 µl ; ADN plasmidique 10 µl d’une solution à 200 µg/ml = 2µg d’ADN/puits) sont ajoutés goutte à goutte sous agitation à 50 µl de solution de PEI (NaCl 9 %o, 45.5 µl ; PEI 10 µM, 4.5 µl).

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

► Transfection des cellules :

Addition de 100 µl de complexe à 900 µl de DMEM 1X sans SVF, 1% pénicilline/streptomycine.
Centrifugation des plaques de culture 5 min à 1500 tours/min.
Incubation 2 heures à 37°C en présence du complexe.

► Elimination du complexe et remplacement par 2 ml de milieu culture complet.
► Incubation des cellules dans les conditions standards jusqu’à analyse.

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

1.1.c. Microscopie de fluorescence.

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

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

1.2. Résultat.

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

![Figure 35](image)

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

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

2. Modifications nucléaires.

2.1. Condensation de la chromatine.

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

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

2.2.a. Test TUNEL®

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

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

2.2.a.i. Matériel et méthodes.

Culture cellulaire et transfection transitoire.

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

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

Les contrôles sont constitués par :

- des cellules non transféctées
- des cellules traitées à la DNasel
- des cellules traitées à la staurosporine
Détection des fragments d’ADN.

36 heures après la transfection :

- Lavage 2 fois 5 minutes sous agitation au PBS

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

- Lavage 2 fois 5 minutes sous agitation au PBS

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

- Lavage 2 fois 5 minutes sous agitation au PBS

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

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

- Retrait des lamelles

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

  15 min à température ambiante sous agitation

- Lavages 3 fois 5 minutes sous agitation au PBS.

**Analyse en microscopie de fluorescence.**

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

2.2.a.ii. Résultat.

Les contrôles (figure 36 a) constitués des cellules non transfectées, traitées à la staurosoporine ou à la DNase I permettent de valider la technique. Les noyaux des cellules apoptotiques apparaissent fluorescents.
RESULTATS. Chapitre 1 *Galig* inducteur de la mort cellulaire.

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

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

Les cellules transfectées avec les vecteurs pORF2-DsRED2 (codant mitogaligine-DsRED2 et la cytogaligine) et pORF1-DsRED2 (codant cytogaligine-DsRED2 et la mitogaligine) ne présentent pas de noyaux fluorescents (figure 36 b). Les quelques cellules positives pour le marquage TUNEL ne sont jamais marquées en rouge et témoignent d’une apoptose spontanée.
RESULTATS. Chapitre 1 *Galig* inducteur de la mort cellulaire.

![Figure 36 b: Absence du clivage de l’ADN, en fragments oligonucléosomaux, des cellules exprimant *galig*.](image)

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

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

3. **Altérations des mitochondries.**

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

4.1. Libération du cytochrome c.

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

4.2. Activation des caspases.

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

4.2.a. Clivage de PARP.

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

4.2.a.i. Matériel et méthodes.

\textbf{Culture cellulaire.}

Les cellules HeLa sont mises en culture dans des boîtes 6 puits à raison de 2.10^5 cellules par puits, 24 heures avant la transfection (chapitre 1, II.1.1.a).

\textbf{Transfection transitoire.}

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

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

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

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

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

► Le lysat cellulaire est traité au potter.

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

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

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

► Reprise des échantillons (quantité représentant une DO₆₀₀ₙₐₚ=1) dans une solution de charge (4% SDS, 100Mm Tris-HCl 12% glycérol, 2% ß-mercaptoéthanol, 0.01% bleu de Coomassie G250).

► Dénaturation à 95°C durant 5 min.

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

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

► L’immunodétexion de PARP se fait à l’aide d’un anticorps de lapin anti-PARP (Roche Molecular Biochemicals) utilisé au 1 : 3000ème et d’un kit de détection (Roche Biomolecular Biochemicals, Ottweiler, Allemagne) selon les recommandations du fabricant.

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

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

![Figure 37](image)

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

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

4.2.b. Test PhiPhilux®.

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

4.2.b.i. Matériel et méthodes.

**Culture cellulaire et transfection transitoire.**

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

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

Les contrôles sont constitués de cellules non transfectées ou incubées 1 heure avec 1 mM de H₂O₂.
**Révélation de l’activité de la caspase-3.**

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

**4.2.b.ii. Résultat.**

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

![Figure 38: Activation de la caspase-3 dans les cellules traitées à l’eau oxygénée.](image)

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

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

Cette expérience montre que les cellules exprimant *galiig* ne présentent pas d’activation de la caspase-3.
RESULTATS. Chapitre 1 *Galig* inducteur de la mort cellulaire.

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

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

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

5. Galig et les protéines Bcl-2 et Bcl-XL.

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

La figure 12 (article chapitre 1) rend compte de l’effet de la co-expression des galigines et de la protéine anti-apoptotique Bcl-XL sur la libération cytosolique du cytochrome c en transfection transitoire. Ces expériences suggèrent un effet protecteur de Bcl-XL lors de l’expression de galig. En effet, la quantité estimée de cytochrome c détectée dans ce surnageant cellulaire est significativement inférieure à celle détectée dans le surnageant cellulaire obtenu lors de la seule expression de galig. Par contre, ce même effet protecteur n’a pas pu être établit pour la protéine anti-apoptotique Bcl-2.

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

5.1. Matériel et méthodes.

Culture cellulaire, transfection transitoire.

Les cellules HeLa sont mises en culture dans des boîtes 12 puits à raison de 8.10⁴ cellules par puits, les cellules sont co-transfectées, avec 1 µg de chacun des ADN (chapitre 1, II.1.1.a), par les vecteurs pORF2-DsRED2 codant la mitogaligine-DsRED2 + la cytogaligine et :

- pEGFP-N3 codant EGFP.
- pGFP-Bcl-XL codant la protéine Bcl-XL fusionnée à EGFP.
- pGFP-Bcl-2 codant la protéine Bcl-2 fusionnée à EGFP.
Les cellules sont observées 40 heures après transfection en microscopie de fluorescence.

5.2. Résultat.

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

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

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

5.3. Conclusion.

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


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

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

<table>
<thead>
<tr>
<th>Noyau</th>
<th>Membrane cellulaire</th>
<th>Cytoplasme</th>
<th>Caractéristiques biochimiques</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Condensation partielle des acides nucléiques</td>
<td>Pas de rupture de la membrane</td>
<td>Diminution du volume cellulaire.</td>
<td>Libération cytosolique de cytochrome c.</td>
</tr>
<tr>
<td>Pas de coupure inter-nucléosomique, pas d’effet TUNEL</td>
<td>Pas de bourgeonnements</td>
<td>Augmentation de la granularité.</td>
<td>Activation de la caspase-3 non détectée.</td>
</tr>
<tr>
<td>Pas d’échelle d’ADN détecté (non montré)</td>
<td>Redistribution de la phosphatidylsérine</td>
<td>Condensation et agrégation des mitochondries.</td>
<td>Effet protecteur de Bcl-X₅.</td>
</tr>
</tbody>
</table>
III. Galig et galectine-3.

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

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

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

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

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

1. Matériel et méthodes.

1.1. Culture cellulaire, transfection transitoire.

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

Une expérience contrôle consiste à transfacter pHG3 et pEGFP N3.
1.2. Détection du cytochrome c cytosolique.

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

2. Résultat.

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

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

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

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

3. Conclusion.

Ce résultat est concordant avec des expériences de microscopie. En microscopie de fluorescence, la morphologie des cellules co-transfectées avec galig et galectine-3 est comparable à celle de cellules transfectées par galig seul et montre des cellules mortes.
CHAPITRE 2: Etude des relations structure/fonction de la mitogaligine.

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

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

Ce premier résultat illustre l’originalité de la mitogaligine puisque les signaux d’adressages mitochondriaux sont le plus généralement situés dans la partie N-terminale des protéines (Pfanner et al., 1997). Cependant, la mitogaligine ne constitue pas une exception, d’autres protéines sont connues pour détenir des séquences internes assurant leur localisation intracellulaire. Ces signaux comportent de nombreux acides aminés hydrophobes, hydroxylés (Ser, Thr) et de nombreuses charges positives (Arg et Lys).

Dans le but d’affiner l’étude des relations structure/localisation, nous avons voulu déterminer la séquence minimale capable de cibler la mitogaligine à la mitochondrie. Pour ce faire, nous avons construit, à partir du plasmide p MG-31_54 EGFP, différents vecteurs produisant des formes délétées en N-terminal et C-terminal du peptide de localisation mitochondrial.

1. Matériel et méthodes.

1.1. Construction des vecteurs.

Les délétions sont produites en une seule étape en réalisant une PCR inverse (Ochman et al., 1988) à partir de la matrice pMG-31_54 EGFP (figure 43).
RESULTATS. Chapitre 2. Relations structure/fonction de la mitogaligine.

Figure 43 : Schéma de PCR inverse.

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

Le milieu réactionnel (50 µl) contient :
- 10 ng d’ADN matrice, (plasmide p MG-31_54 EGFP)
- 1 µM de chacune des amorces
- 0,2 mM de dNTP (désoxyribonucléotides sous forme triphosphate)
- une unité de *Pfu* ADN polymérase (Promega)
- 5 µl de tampon 10X (Tris-HCl pH 8,8 100 mM, KCl 500 mM, Nonidet P40 0.8%)

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

Trois minutes de dénaturation préalable à 94°C suivies de 30 cycles d’amplification composés de :
- 1 minute de dénaturation à 95°C (séparation des deux brins d’ADN)
- 1 minute d’hybridation avec les amorces, la température est variable suivant la nature et la séquence des couples d’amorces.
- 10 minutes d’extension des amorces à 72°C.

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

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

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

Elution de l’ADN avec le kit d’éluion « QIAquick Gel Extraction Kit-QIAGEN » (selon les recommandations du fabricant).
Digestion de l’éluat (fragments PCR) par l’enzyme de restriction BamHI ou HindIII à 37°C toute la nuit.

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

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

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

Pour la détermination de l’extrémité N-terminale, (pMG-31,32,33,34_54 EGFP) les amorces contiennent, en plus du site de restriction pour l’enzyme HindIII (nucléotides soulignés), la séquence ACC permettant d’obtenir un contexte d’initiation de traduction plus fort (séquence Kozak). Pour la détermination de l’extrémité C-terminale, (pMG-31,50,49,48,47,46 EGFP), les nucléotides soulignés correspondent au site de restriction de l’enzyme BamHI.

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

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

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

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

Extraction des plasmides par "minipreps".

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

Amplification des plasmides pour transfection.
Après vérification par séquençage, les vecteurs sont amplifiés et extraits à l’aide du kit Qiagen Endofree Plasmid Maxi kit (Allemagne) selon les recommandations du fabricant.

Nous obtenons plusieurs vecteurs comportant le promoteur du CMV suivi des ADNc correspondant aux formes tronquées de la séquence de ciblage de la mitogaligine fusionnées avec le gène reporteur de EGFP.
1.3. Culture cellulaire, transfection transitoire, microscopie de fluorescence.

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

<table>
<thead>
<tr>
<th>Plasmide</th>
<th>Sequence</th>
<th>Type</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>pMG-31_54</td>
<td>M**GLSWTGTSRRLPWSTWSLSRSTC</td>
<td>GFP</td>
</tr>
<tr>
<td>pMG-31_50</td>
<td>M**GFLSWTGTSRRLPWSTWSLSRSTC</td>
<td>GFP</td>
</tr>
<tr>
<td>pMG-31_49</td>
<td>M**GFLSWTGTSRRLPWSTWSLSRSTC</td>
<td>GFP</td>
</tr>
<tr>
<td>pMG-31_48</td>
<td>M**GFLSWTGTSRRLPWSTWSLSRSTC</td>
<td>GFP</td>
</tr>
<tr>
<td>pMG-31_47</td>
<td>M**GFLSWTGTSRRLPWSTWSLSRSTC</td>
<td>GFP</td>
</tr>
<tr>
<td>pMG-31_46</td>
<td>M**GFLSWTGTSRRLPWSTWSLSRSTC</td>
<td>GFP</td>
</tr>
</tbody>
</table>

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

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

2. Résultat.

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

2.1. Extrémité N-terminale.

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

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

Etant donné que le vecteur pMG-31_54 EGFP permet la production d'une protéine mitochondriale (figure 45 C), on peut conclure que l'arginine 31 est le premier aa du signal d'adressage de la mitogaligine.
RESULTATS. Chapitre 2. Relations structure/fonction de la mitogaligine.

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

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

Les protéines de fusion EGFP produites par les vecteurs pMG-31_47 à pMG-31_54 EGFP (figure 46 A à E) présentent une localisation mitochondriale, les aa 47 à 54 (WSLSRSTC) ne sont par conséquent, pas indispensables pour l’adressage de la mitogaligine. Par contre, le vecteur pMG-31_46 EGFP produit une protéine de fusion localisée dans le cytosol (figure 46 F). L’extrémité C-terminale est par conséquent délimitée par le Tryptophane (47).
RESULTATS. Chapitre 2. Relations structure/fonction de la mitogaligine.

113

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

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

3. Conclusion.

La séquence interne \( R_{31}GLSWTGSRRLPWSTW_{47} \) constitue la séquence signal nécessaire et suffisante pour adresser la mitogaligine à la mitochondrie.
II. Localisation mitochondriale et fuite de cytochrome c.

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

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

1.1. Matériel et méthodes.

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

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

1.1.a.ii. Détection du cytochrome c.

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

1.2. Résultat.

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

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

A l'inverse, les vecteurs pMG-32_54 EGFP et pMG-31_46 EGFP qui n'adressent pas la mitogaligine à la mitochondrie, indiquent une forte diminution du cytochrome c cytosolique (piste 6 et 7).
RESULTATS. Chapitre 2. Relations structure/fonction de la mitogaligine.

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


1.3. Conclusion.

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

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

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

2.1. Matériel et méthodes.

2.1.a. Culture cellulaire, Transfection transitoire.

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

![Western Blot Image]
pORF2-EGFP codant la mitogaligine-EGFP et la cytogaligine
pMG-EGFP codant la mitogaligine-EGFP
pORF1-EGFP codant la cytogaligine -EGFP et la mitogaligine
pCG-EGFP codant la cytogaligine-EGFP

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

2.1.b. Détection du cytochrome c cytosolique.

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

2.2. Résultat.

La piste 5 (figure 48), est un contrôle correspondant au cytochrome c détecté dans le surnageant des cellules transfectées par le vecteur p EGFPN3. Comme cela a déjà pu être observé, l’expression de galig induit le relargage cytosolique de cytochrome c mitochondrial pistes 1 et 3. Par ailleurs, ces cellules montrent de profondes altérations morphologiques et meurent. D’une façon surprenante, la présence de cytochrome c cytosolique peut également être détectée dans le surnageant des cellules exprimant la mitogaligine seule ou la cytogaligine seule, pistes 2 et 4.
RESULTATS. Chapitre 2. Relations structure/fonction de la mitogaligine.

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

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

2.3. Conclusion.

Bien que l’expression de galig soit toxique pour les cellules, ces résultats montrent que cette cytotoxicité ne peut pas être reliée uniquement à la libération extramitochondrial de cytochrome c. En effet, l’expression de la mitogaligine seule ou de la cytogaligine seule permet la détection de cytochrome c dans les surnageants des lysats cellulaires. Ce résultat est d’autant plus surprenant pour la cytogaligine qui présente une localisation majoritairement cytosolique et nucléaire. En revanche, l’expression d’une seule des deux protéines n’induit ni de modifications sévères de la morphologie des cellules ni la mort de ces cellules. Ainsi, il semble que la cytotoxicité du gène galig repose sur l’expression des deux protéines qu’il code : la mitogaligine et la cytogaligine. Mais, il apparaît également que la libération du cytochrome c ne constitue pas le seul effecteur de la cytotoxicité induite par galig puisque la production d’une seule des 2 protéines suffit au relargage de cet effecteur pro-apoptotique.
CHAPITRE 3 : Production d’anticorps dirigés contre la cytogaligine.

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

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

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

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

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

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

CLR-up 5’ TCT AGA TCT TAT GAT GCG TTA TCT GGG TCT 3’
LB-Low 5’ TCT AGA ATT CAG TGG CCC AGC AGG GGC GCC AT 3’

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

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

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

2ème jour : Culture.

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

- L’induction à l’IPTG est réalisée lorsque la culture bactérienne a atteint une DO600nm comprise entre 0,65 et 0,8. Au temps 0 de l’induction, le prélèvement d’un échantillon de 5 ml de culture bactérienne est effectué, mis en culture dans un tube de 50 ml à 37°C afin de constituer des témoins de non-induction. Le reste de la culture est induit avec de l’IPTG à 1 mM final pendant 3h à 37°C. Le temps d’induction est critique, il est important de ne pas aller au-delà de façon à éviter les problèmes de cytotoxicité.

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

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

3ème jour :

- Reprise des culots dans tampon phosphate (pH 7.8 Na2HPO4 20 mM, NaCl 500 mM).
- **Sonication des bactéries** 5 fois 1 minute à 4°C. Les sonicats sont centrifugés (5000 rpm, 15 mn, 4°C), les surnageants sont recentrifugés (15000 rpm, 20 min, 4°C). Les surnageants issus de cette 2ème centrifugation sont conservés pour l’étape de purification sur colonne.

- **Purification** : 1 à 2 ml de résine (ProBond resin, invitrogen) sont coulés dans la colonne laquelle est lavée avec 20 ml H2O, équilibrée avec 20 ml de tampon phosphate de sodium pH7.8. Les échantillons sont déposés sur la colonne (vitesse de passage 0.75 ml/min) et lavés :
  
  2 fois 10 ml de tampon phosphate pH 7.8  
  2 fois 10 ml de tampon phosphate pH 6  
  2 fois 10 ml de tampon phosphate pH 6 imidazole 20mM  

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

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

  Tubes 1 à 7 : Tampon phosphate pH 6 imidazole 50mM  
  Tubes 8 à 14 : " " imidazole 75mM  
  Tubes 15 à 21 : " " imidazole 150mM  
  Tubes 22 à 35 : " " imidazole 300mM  

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

### 3. Immunisation.

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

**Tableau 6 : Protocole standard d’immunisation.**

<table>
<thead>
<tr>
<th>Jour</th>
<th>0</th>
<th>14</th>
<th>28</th>
<th>38</th>
<th>56</th>
<th>66</th>
<th>87</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Injection</td>
<td>1ère</td>
<td>2ème</td>
<td>3ème</td>
<td>4ème</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Saignées</td>
<td>pré immune</td>
<td>2 mL</td>
<td>2 + 20 mL</td>
<td>60mL</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>
4. Immunodétection de la cytogaligine.

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

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

4.1.a. Matériel et méthodes.

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

Les cellules HeLa sont mises en culture dans des boîtes 6 puits à raison de 2.10^5 cellules/puits et transfectées avec 6µg d’ADN/puits (chapitre 1, II.1.1.a) avec les plasmides :
- pEGFP N3
- pORF1-EGFP codant la cytogaligine-EGFP et la mitogaligine
- pORF2-EGFP codant la mitogaligine-EGFP et la cytogaligine
- pCG-EGFP codant la cytogaligine-EGFP
- pgalig codant la mitogaligine et la cytogaligine

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

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

4.1.b. Résultat.

Les deux sérums immuns ont été testés par Western-blot (figure 49 A, B). Les résultats obtenus montrent que les sérums anti-cytogaligine des lapins 3722 et 3724 immunisés avec la protéine recombinante Histidine-cytogaligine, fonctionnent en Western-blot et détectent la protéine cytogaligine-EGFP ou de la cytogaligine dans les extraits cellulaires. La taille attendue de la cytogaligine fusionnée à EGFP est de 38 kD, celle de la cytogaligine seule est de 11 kD.
RESULTATS. Chapitre 3. Production d’anticorps anti-cytogaligine.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4.2.a. Matériel et méthodes.

4.2.a.i. Culture cellulaire, transfection transitoire.
Les cellules HeLa sont mises en culture sur des lamelles dans des boîtes 12 puits à raison de $8 \times 10^4$ cellules/puits et transfectées avec 4 µg d’ADN/puits (chapitre 1, II.1.1.a) avec les plasmides :
- pDsRED2 codant la DsRED2
- pORF2-DsRED2 codant la mitogaligine-DsRED2 et la cytogaligine
- pMG-DsRED2 codant la mitogaligine-DsRED2
- pORF1-DsRED2 codant la cytogaligine-DsRED2 et la mitogaligine
- pgalig : vecteur contenant l’ADNc de galig,
- pCG-galig : vecteur obtenu à partir du vecteur p galig par mutation ponctuelle des codons d’initiation de la mitogaligine, et codant la cytogaligine.

4.2.a.ii. Marquage des cellules par les anticorps anti-cytogaligine.
Quarante huit heures après transfection, les cellules cultivées sur lamelles subissent le protocole suivant :
- Lavage 5 minutes sous agitation au PBS
  - **Fixation des cellules** : PFA 4%, 5 minutes à 37°C
- **Perméabilisation des cellules** : 3 lavages PBS-SAB 2% Saponine 0,1%, 5 minutes sous agitation à température ambiante
- **Incubation avec anticorps primaire** :
  - Anti-cytogaligine dilué au 1:2000ème (lapin 3722) en PBS-BSA 2%-Saponine 0,1%, 30-45 minutes, température ambiante en chambre humide
  - Lavage 3 fois 5 minutes sous agitation dans PBS-BSA 2%-Saponine 0,1%
- **Incubation avec l’anticorps secondaire** :
  - Chèvre anti-lapin IgG(H+L) couplé à la FITC (Interchim, France) dilué au 1 :200ème en PBS-BSA 2%-Saponine 0,1%, à température ambiante, 30 min en chambre humide
RESULTATS. Chapitre 3. Production d’anticorps anti-cytogaligine.

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

Rinçage des lamelles à l’eau distillée

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

Analyse en microscopie de fluorescence.

4.2.b. Résultat.

4.2.b.i. Contrôles.

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

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

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

Les cellules HeLa sont observées en microscopie de fluorescence 48h après transfection du vecteur pDsRED2, codant la DsRED2 (A, colonne DsRED2) et pMG DsRED2, codant la mitogaligine-DsRED2 (B, colonne DsRED2). Le bruit de fond lié à la fixation non spécifique de l’anti-cytogaligine apparaît très faiblement marqué et diffus (colonne FITC). De même, l’immun sérum 3722 ne reconnaît pas la mitogaligine-DsRED2.
4.2.b.ii. Transfection des cellules HeLa par un vecteur codant la cytogaligine en fusion avec l’EGFP.

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

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

La localisation de la cytogaligine révélée par l’antisérum, soulève cependant d’autres questions. En effet, le marquage par l’anticorps anti-cytogaligine fait essentiellement apparaître une localisation mitochondriale de la cytogaligine, révélée par la co-localisation avec la mitogaligine-DsRED2 (figure 51, colonne **FITC + DsRED2**). Il convient de noter également une fluorescence verte très diffuse et de faible intensité dans le cytosol et le noyau (figure 51 ligne **A, B** colonne **FITC**). Ce constat est *a priori* surprenant puisque la localisation de la cytogaligine-EGFP, précédemment décrite ([Guittaut et al., 2001] et figure 52), s’était révélée essentiellement cytosolique et nucléaire, le marquage mitochondrial étant nettement plus faible. Ce point est discuté en conclusion du chapitre.
RESULTATS. Chapitre 3. Production d’anticorps anti-cytogaligine.

Figure 51 : Immunomarquage de la cytogaligine par l’anti-sérum du lapin 3722.
Les cellules HeLa sont transfectées avec le vecteur pORF2-DsRED2 codant la mitogaligine-DsRED2 et la cytogaligine (A, B, C). 48h après transfection, les cellules sont observées en microscopie de fluorescence pour l’expression de la mitogaligine-DsRED2 (colonne DsRED2) et pour la détection de la cytogaligine par l’anti-sérum du lapin 3722 (colonne FITC). La colonne de droite représente la superposition des photographies des colonnes FITC et DsRED2 (FITC + DsRED2).

Figure 52 : Distribution intracellulaire de la cytogaligine-EGFP.
Les cellules HeLa sont transfectées avec le vecteur pORF1-EGFP codant la cytogaligine-EGFP et la mitogaligine. 24h après transfection, les cellules sont observées en microscopie de fluorescence pour l’expression de la cytogaligine fusionnée à EGFP.
RESULTATS. Chapitre 3. Production d’anticorps anti-cytogaligine.

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

Les anticorps anti-cytogaligine ont également été testés sur des cellules HeLa transfectées par le vecteur pgalig contenant l’ADNc de galig et codant les deux protéines mitogaligine et cytogaligine non fusionnée à un gène reporteur (figure 53 A, B).
La fluorescence associée à la reconnaissance de la cytogaligine présente une localisation similaire à celle de la figure 51 où les cellules étaient transfectées par un vecteur codant la mitogaligine-DsRED2 et la cytogaligine. Là encore, on remarque une fluorescence ponctiforme ainsi qu’une fluorescence nucléaire plus faible.

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

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

**Figure 53 : Immunomarquage de la cytogaligine.**

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

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

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

On peut poser la question de savoir si la protéine EGFP serait en mesure de provoquer une délocalisation de la cytogaligine, de sorte que celle-ci apparaisse plus cytosolique. Toutefois, il convient de noter que les expériences de transfection des formes fusionnées de la cytogaligine sont observées sur des cellules vivantes alors que les expériences d'immunofluorescence requièrent la perméabilisation et la fixation des cellules. Il serait donc possible que cela entraîne une certaine fuite de la cytogaligine soluble, ce qui pourrait diminuer l'intensité du marquage cytosolique.
RESULTATS. Chapitre 4. Initiation de traduction de la cytogaligine.

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

I. Introduction.

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

![Figure 54 : Structure de l’ADNC galig dans la région de l’initiation de traduction des galigines.](image)

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

L’ADNC du gène galig a été utilisé pour construire le vecteur d’expression pgalig. Ce plasmide a servi de base pour construire des vecteurs modifiés. Des expériences antérieures ont montré notamment que la délétion de toute la séquence correspondant à l’intron 2 de \textit{LGALS3} permettait toujours la production de la mitogaligine et de la cytogaligine (non montré). Ainsi, le site d’initiation probable de la cytogaligine pouvait être soit l’un ou l’autre des deux AUG contigus localisés en position +5 +10 sur la partie correspondant de l’exon 3 (voir séquence figure 54).
RESULTATS. Chapitre 4. Initiation de traduction de la cytogaligine.

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

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

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

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

Le vecteur pMG-galig a été obtenu à partir du plasmide pgalig par mutations ponctuelles des deux codons ATG_{Cyt1,Cyt2} contigus et des codons leucine (CTG et CTC) de la cytogaligine. On s’attend, à ce que la production de la cytogaligine ne soit pas possible, lors de la transfection des cellules par ce vecteur. Contre toute attente, les expériences d’immunofluorescences ont prouvé le contraire (figure 53 photos D). Ces observations laissent entendre qu’il doit exister un autre site d’initiation de traduction pour la protéine. Ce site d’initiation de traduction pourrait se situer dans l’intron 2. Huit codons AUG sont identifiés dans la séquence leader de l’ARNm de galig. Tous sont associés à des phases de lecture très courtes, de quelques aa seulement (figure 55). De plus, on rappelle que la délétion de cette séquence leader ne perturbe pas la production de la cytogaligine (non montré).
RESULTATS. Chapitre 4. Initiation de traduction de la cytogaligine.

Figure 55 : Phases de lecture ouvertes présentes dans la région 306 à 695 de l’intron 2 du gène LGALS3.
Les 8 codons initiateurs AUG (nombres en rouge) sont associés à de courtes phases de lecture ouvertes (ORF I à ORF VIII) localisés dans l’intron 2 de LGALS3, lequel contient le promoteur de galig et ses séquences régulatrices. La numérotation correspond au positionnement des codons ATG par rapport au nucléotide +1 de l’intron 2 du gène de la galectine-3. Les sites d’initiation de transcription sont localisés avant le nucléotide 300.

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

Une nouvelle étude a alors été initiée dans le but de déterminer si ces codons AUG pouvaient effectivement être utilisés en tant que sites d’initiation de traduction. Pour réaliser ces expériences, nous sommes partis d’un vecteur disponible au laboratoire qui avait été construit pour caractériser les séquences régulatrices du gène galig. Ce vecteur est schématisé figure 56.
RESULTATS. Chapitre 4. Initiation de traduction de la cytogaligine.

Figure 56 : Structure du vecteur pCMV306-356luc.

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

Dans ce vecteur d’expression, l’ARNm de la luciférase possède un ARNm leader correspondant à la séquence 306 à 356 de l’intron 2. Dans cette séquence, on retrouve les deux AUG321_323 et AUG348_350. Ainsi, l’ATGluc est précédé des deux ATG de la séquence leader du petit ARNm de galig. Ce vecteur montrait une activité luciférase relativement faible, lorsqu’on la comparait à celle d’un vecteur ne contenant pas la séquence 306 à 356 de l’intron 2. Une analyse détaillée de la séquence de ce vecteur fait apparaître que les ATG321_323 et ATG348_350 de l’intron 2 sont en phase l’un avec l’autre mais sont dans un cadre de lecture différent de celui de la luciférase. Ces ORF s’arrêtent au début de la luciférase en aval de l’ATGluc.

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

Le promoteur CMV est localisé en amont de la séquence comportant les nucléotides 306 à 356 de l’intron 2 du gène LGALS3 et du gène rapporteur luciférase. Les deux codons ATG321_323 et 348_350 sont associés respectivement aux ORFI et ORFII. Le nucléotide 356 correspond à un site donneur d’épissage conduisant à la production du petit ARNm de galig. Les deux ORF I et II sont dans un même cadre de lecture.

En prenant ces points en considération, on peut imaginer que l’un ou l’autre des codons ATG321_323 ou ATG348_350 est utilisé pour initier la traduction des ORFI et ORFII. Ceci pourrait expliquer la faible activité luciférase du vecteur pCMV306_356luc, le ribosome étant déjà mobilisé lorsqu’il arrive au niveau de l’ATGluc.
RESULTATS. Chapitre 4. Initiation de traduction de la cytogaligine.

Deux constructions ont été réalisées afin de tester cette hypothèse :

- Un nucléotide adénine (A) a été inséré en position 356 de manière à mettre en phase les ORFs initiés à partir des ATG_{321,323} ou ATG_{348,350} et l'ATG de la luciférase. Dans ce cas, si l'un ou l'autre des deux ATG est utilisé pour initier la traduction, nous pouvons nous attendre à constater une augmentation de l'activité luciférase, car il y aurait possibilité de production d'une luciférase chimère.

![Figure 58 : Structure du vecteur p356ins-A.](image1)

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

- Les nucléotides (TAG) ont été incorporés en position 354, 355, 356 de manière à introduire un codon STOP, 3 nucléotides après l'ATG_{348,350}. Dans ce cas, l'ATG_{luc} se trouve en aval de la première phase de lecture. Le ribosome pourrait ainsi se trouver en mesure de ré-initier la traduction et nous devrions alors observer également une augmentation de l'activité luciférase.

![Figure 59 : Structure de vecteur p356ins-STOP.](image2)

Le promoteur CMV est localisé en amont de la séquence comportant les nucléotides 306 à 356 de l'intron 2 du gène LGALS3 et du gène rapporteur luciférase. L'insertion des nucléotides TAG (en rouge) en position 354, 355, 356 introduit un codon STOP, ce qui raccourcit les ORF I et ORF II associés respectivement aux ATG_{321,323} et ATG_{348,350}. Le vecteur ainsi construit ne permet plus la traduction des ORF I et II fusionnées au gène rapporteur luciférase.
II. Initiation de traduction de la cytogaligine dans
l’ARNm leader du petit ARNm de galig.
1. Matériel et méthodes.

1.1. Constructions des différents vecteurs.

1.1.a. Vecteur matrice.

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

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

Les mutations sont introduites dans les plasmides par la technique de PCR à
partir du vecteur matrice pCMV306-356luc. Les amorces utilisées pour la construction
des vecteurs d’expression eucaryotes sont porteuses des mutations (insertion d’un A ou
d’un codon STOP). La séquence 306 à 356 de l’intron 2 est amplifiée par PCR avec les
amorces CMVpromF contenant le site de restriction pour l’enzyme NdeI (nucleotides
soulignés : CATATG) et les amorces 342-356Ins-A et 342-356Ins-Stop contenant le site
de restriction pour l’enzyme HindIII (nucleotides soulignés AAGCTT) :
Amorce 342-356Ins-A : 5’ CGGAATGCCAAGCTTTTTTCATCACCGT 3’
Amorce 342-356Ins-Stop: 5’ CGGAATGCCAAGCTTCTATTTCATCACCGT 3’
Amorce CMVpromF : 5’ AGTACATCAAGTGTATCATATG CCAAGTA 3’
Les amorces contiennent soit l’insertion d’un T ou des nucléotides CTA (en rouge) par
rapport à la séquence matrice. Le fragment PCR est digéré par NdeI + HindIII et inséré
dans les mêmes sites dans pCMV3-luc. Les plasmides sont extraits, puis séquencés
avant d’être amplifiés.

1.1.c. Culture cellulaire et transfection transitoire.

Vingt-quatre heures avant la transfection, les cellules HeLa sont réparties à raison
de 4.10^4 cellules par puits. Les plasmides codant la luciférase de photinus pyralis sont
co-transfectés avec un vecteur de référence : phRL-SV40 (Promega, Madison, WI)
contenant le gène de la luciférase de Renilla reniformis en aval du promoteur SV40
(chapitre 1, II). La mesure de l’activité de ces gènes rapporteurs est réalisée 48 heures
après la transfection des cellules.

La co-transfection de phRL-SV40 permet de minimaliser la variabilité introduite par la
transfection. En effet, pour comparer l’initiation de traduction des différents vecteurs, il
faut s’assurer que l’efficacité de transfection est comparable dans les diverses expériences. L’activité luciférase de *Renilla photinus pyralis* introduite par le vecteur phRL-SV40 servira de contrôle interne d’efficacité de transfection et de reproductibilité.

**1.1.d. Mesure de l’activité luciférase.**

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

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

**1.2. Résultat.**

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

![Figure 60](image)

Comme attendu, le vecteur pCMV306-356luc présente une activité luciférase très faible. Il est possible que la mobilisation du ribosome depuis les AUG_{321,323} ou AUG_{348,350} le rende indisponible pour initier la traduction au niveau de l’AUGluciférase (figure 60).
L’insertion d’un codon STOP (figure 59) en amont de l’ATG\textsubscript{luciférase} provoque une forte augmentation de l’activité luciférase. Ainsi, on peut penser que ce codon STOP permet de libérer le ribosome, et de le rendre disponible pour ré-initier une traduction sur l’ATG\textsubscript{luc} localisé en aval. Cette "stratégie" est fréquemment observée dans les gènes eucaryotes, une ORF courte est présente en amont d’une ORF longue. Ces séquences ont pour rôle d’augmenter le niveau de traduction (Meijer et Thomas, 2002).

De même, du fait de l’insertion d’un A en position 356 (p356-insA), les ORFI et ORFII se retrouvent en phase avec l’ORF de la luciférase (figure 58). Le ribosome peut donc théoriquement initier la traduction sur l’ATG\textsubscript{321-323} ou l’ATG\textsubscript{348-350}, pour produire des luciférases chimères ou sur l’ATG\textsubscript{luc}, pour produire une luciférase normale. L’activité luciférase observée est sensiblement augmentée, ce qui montre que les ATG\textsubscript{321-323} ou ATG\textsubscript{348-350} peuvent effectivement être utilisés pour initier de la traduction.

**1.3. Conclusion.**

Les résultats observés montrent que la séquence 306-356 de l’intron 2, séquence que l’on retrouve dans le petit l’ARNm de \textit{galig}, contient deux codons AUG, et que l’un ou l’autre peut être utilisé pour initier de la traduction. Ces deux codons AUG se retrouvent dans un contexte Kozak faible, il reste à établir lequel de ces deux ATG est réellement utilisé. L’initiation de la traduction de la cytogaligine apparaît complexe. Il semble que plusieurs sites d’initiation de traduction, localisés dans l’intron 2 ou dans l’exon 3, soient utilisables. Par ailleurs, il convient de rappeler que la délétion totale de l’intron 2 n’empêche pas l’initiation de traduction de la cytogaligine dans l’exon 3. Ceci laisse supposer que l’initiation de traduction de la cytogaligine est soumise au phénomène de leaky scanning.
CHAPITRE 5 : Détection des ARNm de *galig* par RT-PCR quantitative.

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

I. Principe.

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

![Figure 61 : Principe de la PCR-quantitative.](image-url)
II. Quantification des ARNm de galig.

1. Matériel et méthodes.

1.1. Contrôle des amorces

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

![Diagramme](image)

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

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

La spécificité des amorces (présentées tableau 7) a été vérifiée par PCR sur les ADNc de chaque gène (résultat non montré). Nous nous sommes assurés, en particulier, que le couple d’amorces GLG-QT-02F et GLG-QT-04R ne produisent pas de fragments PCR avec les plasmides pHG3 et pgalig.
Tableau 7 : Couples d’amorces et conditions PCR utilisées pour l’amplification et la quantification des ARNm des formes longue et courte de galig, de la galectine-3 et de GAPDH.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Nom du plasmide</th>
<th>Amorces</th>
<th>Séquences des amorces</th>
<th>Tm</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td></td>
<td>GLG-QT-04F</td>
<td>5’GTGTATGTCCTTTCTTTCCAGCTC 3’</td>
<td>57,2°C</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>GLG-QT-04R</td>
<td>5’ATCCTTGAGGGTTTGGGTT 3’</td>
<td>58,3°C</td>
</tr>
<tr>
<td>pHi446A</td>
<td>GLG-QT-02F</td>
<td>5’TTCCTACGCTTGATGAAAATTCCTC 3’</td>
<td>59,2°C</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>GLG-QT-04R</td>
<td>5’ATCCTTGAGGGTTTGGGTT 3’</td>
<td>58,3°C</td>
</tr>
<tr>
<td>pHG3</td>
<td>GAL3-QT-02F</td>
<td>5’GGCAGACAATTGTTGCTC 3’</td>
<td>58,4°C</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>GLG-QT-04R</td>
<td>5’ATCCTTGAGGGTTTGGGTT 3’</td>
<td>58,3°C</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>HP-GLG01</td>
<td>FAM5’CATGATGCGTTATCTGGGTCTTGGTA3’ TAMRA</td>
<td>67,3°C</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>GAPDH3</td>
<td>5’CATCAATGGAGATCCCATCAC 3’</td>
<td>58,3°C</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>GAPDH2</td>
<td>3’AGAAGGCAGGGCTCATTT 5’</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>HP-GAPDH</td>
<td>FAM5’CATCTTCCAGGAGCGAGATCCCTC3’ TAMRA</td>
<td>69°C</td>
</tr>
</tbody>
</table>

1.2. PCR

Le milieu réactionnel (25 µl) contient :
- L’ADNc
- 0,3 µM de chacune des amorces
- 0,1 µM de sonde TaqMan
- 12,5 µl 2x QuantiTect Probe Master Mix (Tris Cl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 8 Mm MgCl₂, pH 8,7 + dNTP + HotStarTaq DNA Polymérase)

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

Quinze minutes de dénaturation préalable à 95°C suivie de 45 cycles d’amplification composés de :
- 45 secondes de dénaturation à 95°C
- 45 secondes d’hybridation à 59°C
- 45 secondes d’extension des amorces à 72°C.

Les études antérieures ont permis de dégager des spécificités dans l’expression du gène galig. Les résultats obtenus ont révélé :
Que le promoteur du gène *galig* n’est pas constitutif et que son expression est régulée différemment selon les tissus.

Que l’expression du gène *galig* est indépendante de celle du gène de la *galectine-3* puisqu’il existe des tissus dans lesquels seul l’un ou l’autre des transcrits est exprimé.

Que la transcription du gène *galig* semble dépendante de la différenciation cellulaire.

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

2. Résultat.

2.1. Calibration.

Nous avons validé notre système en comparant le gène de la *galectine-3*, dont l’expression est augmentée lors de la différenciation en macrophage, avec les formes longues et courtes de *galig*. Le contrôle interne est effectué avec le gène *GAPDH* dont l’expression est constitutive. La calibration est effectuée en réalisant des RT-PCR quantitatives sur une gamme de dilution de chacun des plasmides contenant les ADNc de la *galectine-3*, de *GAPDH* ou des formes longues et courtes de *galig*. Il est tracé le Ct (Threshold Cycle) en fonction du log10 du nombre de copies. Le Ct représente un nombre de cycle correspondant au seuil où le signal de fluorescence émerge du bruit de fond.

![Courbes d'étalonnages obtenues pour chaque plasmide.](image)

*Figure 63 : Courbes d’étalonnages obtenues pour chaque plasmide.*
Les droites étalons permettent de déterminer les coefficients directeurs (a) et les ordonnées à l’origine (b). Les équations de droite pour chaque plasmide sont calculées et reportées dans le tableau 8.

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

<table>
<thead>
<tr>
<th>Nom du plasmide</th>
<th>Ct=aX+b</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>pgalig</td>
<td>-3,898X+42,75</td>
</tr>
<tr>
<td>pHi-446A</td>
<td>-3,41X+40,15</td>
</tr>
<tr>
<td>pHG3</td>
<td>-3,311X+40,53</td>
</tr>
<tr>
<td>pGAPDH</td>
<td>-3,608X+41,04</td>
</tr>
</tbody>
</table>

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

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

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

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

<table>
<thead>
<tr>
<th>Qtité ARN (ng)</th>
<th>- PMA</th>
<th>+ PMA</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td></td>
<td>Ct</td>
<td>Nbre molécules</td>
</tr>
<tr>
<td>1</td>
<td>26,71</td>
<td>9370</td>
</tr>
<tr>
<td>10</td>
<td>23,23</td>
<td>86348</td>
</tr>
<tr>
<td>100</td>
<td>19,754</td>
<td>793720</td>
</tr>
<tr>
<td>300</td>
<td>18,095</td>
<td>2288745</td>
</tr>
<tr>
<td>500</td>
<td>17,323</td>
<td>3745008</td>
</tr>
</tbody>
</table>
RESULTATS. Chapitre 5. RT-PCR quantitative des ARNm de *galig*.

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

<table>
<thead>
<tr>
<th>Qttité ARN (ng)</th>
<th>Ct</th>
<th>Nb molécules</th>
<th>gal3/GAPDH</th>
<th>Ct</th>
<th>Nb molécules</th>
<th>gal3/GAPDH</th>
<th>Amplification</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>- PMA</td>
<td>1</td>
<td>33,5</td>
<td>182</td>
<td>19.42.10^-3</td>
<td>30,14</td>
<td>2192</td>
<td>349.71.10^-3</td>
</tr>
<tr>
<td>10</td>
<td></td>
<td>30,207</td>
<td>2086</td>
<td>24.16.10^-3</td>
<td>26,665</td>
<td>28721</td>
<td>437.65.10^-3</td>
</tr>
<tr>
<td>100</td>
<td></td>
<td>26,914</td>
<td>23886</td>
<td>30.09.10^-3</td>
<td>23,19</td>
<td>376325</td>
<td>547.69.10^-3</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Moyenne 18.1

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

<table>
<thead>
<tr>
<th>Qttité ARN (ng)</th>
<th>Ct</th>
<th>Nb molécules</th>
<th>galig L/GAPDH</th>
<th>Ct</th>
<th>Nb molécules</th>
<th>galig L/GAPDH</th>
<th>Amplification</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>- PMA</td>
<td>1</td>
<td>36,02</td>
<td>53</td>
<td>5.66.10^-3</td>
<td>36,22</td>
<td>47</td>
<td>7.5.10^-3</td>
</tr>
<tr>
<td>10</td>
<td></td>
<td>32,465</td>
<td>435</td>
<td>5.04.10^-3</td>
<td>32,77</td>
<td>363</td>
<td>5.53.10^-3</td>
</tr>
<tr>
<td>100</td>
<td></td>
<td>28,91</td>
<td>3553</td>
<td>4.48.10^-3</td>
<td>29,32</td>
<td>2788</td>
<td>4.06.10^-3</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Moyenne 1,1

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

<table>
<thead>
<tr>
<th>Qttité ARN (ng)</th>
<th>Ct</th>
<th>Nb molécules</th>
<th>galig C/GAPDH</th>
<th>Ct</th>
<th>Nb molécules</th>
<th>galig C/GAPDH</th>
<th>Amplification</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>- PMA</td>
<td>100</td>
<td>37,772</td>
<td>5</td>
<td>6.29.10^-6</td>
<td>35,2</td>
<td>28</td>
<td>4.07.10^-5</td>
</tr>
<tr>
<td>300</td>
<td></td>
<td>36,048</td>
<td>16</td>
<td>6.29.10^-6</td>
<td>33,673</td>
<td>79</td>
<td>3.74.10^-5</td>
</tr>
<tr>
<td>500</td>
<td></td>
<td>35,246</td>
<td>27</td>
<td>7.2.10^-6</td>
<td>32,963</td>
<td>128</td>
<td>3.6.10^-5</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Moyenne 5,8
RESULTATS. Chapitre 5. RT-PCR quantitative des ARNm de *galig*.

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

![Figure 64: Effets du PMA dans les cellules THP1 sur l’expression des ARNm de *LGALS3* et des formes longues et courtes de *galig*.](image)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.1. Activation des caspases.

Le cytochrome c une fois libéré de la mitochondrie participe à la formation de l’apoptosome. Cependant, cette relocalisation du cytochrome c dans le cytosol ne garantit pas le déclenchement de l’apoptose (Deshmukh et Johnson, 1998; Li et al., 2005). Deux techniques ont été utilisées afin de déterminer si la délocalisation du cytochrome c était effectivement à l’origine de l’activation de la caspase-3. La première, basée sur la coupure d’un substrat fluorescent de la caspase-3 (test PhiPhilux) (Packard et al., 1996), indique que les cellules exprimant galig ne présentent pas d’activation de cette protéase (figure 39). La seconde technique repose sur la détection du fragment de PARP clivé, une enzyme nucléaire substrat de la caspase-3. De nouveau, aucune activation de la
caspase-3 peut être mise en évidence (figure 37). Il faut noter que la PARP est également un substrat pour la caspase-7.

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

2.2. Potentiel membranaire mitochondrial.

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

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

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

### 3.1. Marquage à l'annexine V.

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

### 3.2. Marquage Hoechst 33342.

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

### 3.3. Test TUNEL.

Les cellules HeLa exprimant la mitogaligine-DsRED2 et la cytogaligine sont toujours négatives pour le marquage par la technique TUNEL (figure 36 b). Ce résultat montre que l'expression de *galig* n'induit pas l'activation d'endonucléases responsables d'un clivage de l'ADN générant des extrémités 3'OH libres, et n'induit donc pas la fragmentation inter-nucléosomique de l'ADN.
Ces expériences confortent l'idée que la MCP initiée par galig présente des caractéristiques différentes de celles que l'on attendrait pour l'apoptose, en particulier une absence d'activation de la caspase-3 et de dégradation inter-nucléosomique de l'ADN. Si le marquage à l'annexine V et la condensation de la chromatine sont mis en évidence, ces marqueurs n'apparaissent que lors des stades tardifs du processus de mort.

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

3.4. Inhibition de la mort cellulaire induite par galig.

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

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

Le rôle protecteur de Bcl-X_L sur les protéines pro-apoptotique est connu. Par exemple, Bcl-X_L inhibe la mort induite par Bax, en empêchant la libération de cytochrome c et donc l’activation des caspases (Finucane et al., 1999 ; Kluck et al., 1997; Yang et al., 1997 ). Le rôle de Bcl-X_L serait d’empêcher l’oligomérisation de Bax au niveau de la membrane externe de la mitochondrie et d’inhiber la translocation du cytochrome c des mitochondries vers le cytosol (Wolter et al., 1997). En effet, l’oligomérisation de Bax semble être un évènement nécessaire pour perméabiliser la membrane externe de la mitochondrie puisque sous forme de monomères, Bax, s’avère incapable d’induire la libération des facteurs de mort (Gross et al., 1998). Des analyses spectrales par RMN et par diffraction aux rayons X de Bcl-X_L, en absence de son domaine transmembranaire, ont permis de déterminer que sa structure tri-dimensionnelle comporte sept hélices. Les domaines BH-1, BH-2 et BH-3 forment une poche hydrophobe dans laquelle viennent s’insérer des partenaires de mort (Muchmore et al., 1996). Ainsi, il a été établi que l’hélice u9 correspondant au domaine transmembranaire de la protéine Bax vient se loger dans la poche hydrophobe de Bcl-X_L (Suzuki et al., 2000). La formation de ce complexe empêche Bax d’être transloqué à la mitochondrie et de s’oligomériser.

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

L’apoptose peut occasionner un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire de la mitochondrie, qui peut être responsable d’une augmentation significative de la production de ROS, à l’origine d’effets délétères sur les constituants cellulaires (Xiang et al., 1996). Ainsi, il a été montré que la translocation cytosolique du cytochrome c est associée à une interruption dans le transfert des électrons le long de la chaîne respiratoire et précède le signal oxydant et l’apparition des ROS (Cai et Jones, 1998). Le
rôle des ROS durant l’apoptose a été proposé lorsqu’il a été observé que la protéine anti-apoptotique Bcl-2 présentait des fonctions anti-oxydantes (Kane et al., 1993). Une étude rapporte que la protéine Bax provoque un stress oxydant provoquant l’oxydation des lipides de la mitochondries, et que la co-expression de Bax avec la protéine Bcl-Xₖ prévient cette lipoperoxydation et la mort cellulaire (Priault et al., 2002). Ainsi, il est envisagé d’étudier si la cytotoxicité induite par galig s’accompagne ou ne s’accompagne pas de la production de ROS.

3.4.b. Galig et galectine-3.

Le locus LGALS3 contient deux gènes présentant des fonctions opposées. Le gène de la galectine-3 présente une fonction anti-apoptotique et galig induit la mort cellulaire. L’effet de la co-expression de la galectine-3 et de galig a été étudié afin de déterminer si, à l’image de la protéine Bcl-Xₖ qui protège la mitochondrie de l’activité de Bax, la galectine-3 pouvait exercer un effet protecteur lors de l’expression de galig. Les expériences de co-transfection indiquent l’absence d’un tel effet protecteur tant d’un point de vue de la morphologie des cellules, que de la libération de cytochrome c. Ces résultats suggèrent que l’expression de la galectine-3 ne protège pas la membrane mitochondriale de la perméabilisation induite par l’expression de galig. Dans la mesure où il a été montré que la galectine-3 était transloquée à la membrane mitochondriale lors de l’apoptose et que cette re-localisation inhibait le relargage extra-mitochondrial du cytochrome c, on aurait pu s’attendre à observer le contraire. Par conséquent, nos résultats indiquent que ces gènes présentent des fonctions opposées qui ne sont pas interconnectées.

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

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

1. Localisation intracellulaire de la mitogaligine.

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

2. Activité cytotoxique de la mitogaligine.

2.1. Expression de la mitogaligine et croissance cellulaire.

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

2.2. La mitogaligine induit la libération du cytochrome c.

La transfection de cellules HeLa par des vecteurs produisant la mitogaligine seule ou des formes tronquées de la mitogaligine (figures 45 et 46), indique que la déséquilibration des membranes mitochondriales, à l'origine du relargage du cytochrome c, peut être reliée à l'action de la mitogaligine. En effet, la fuite de cytochrome c vers le
cytosol est mise en évidence dès qu'une forme mitochondriale de la mitogaligine est produite, ceci même en absence de la cytogaligine.

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

Il est connu et admis que la relocalisation de Bax et tBid depuis le cytosol vers les mitochondries induit la libération du cytochrome c (Eskes et al., 1998 ; Finucane et al., 1999 ; Jurgensmeier et al., 1998; Rosse et al., 1998 ). Dans un premier temps, cette libération a été attribuée à leur capacité de moduler l'ouverture du PTP (Jurgensmeier et al., 1998 ; Marchetti et al., 1996 ; Zamzami et al., 1995). Il a également été proposé que Bax puisse former des pores seul ou avec le VDAC, au niveau de la membrane externe de la mitochondrie, permettant ainsi le relargage de molécules effectrices de la mort
cellulaire (Antonsson et al., 1997 ; Shimizu et al., 1999). Les méthodes empruntées au domaine d'étude des peptides antimicrobiens ont permis de mettre en évidence la formation de ces pores (Basanez et al., 2002; Epand et al., 2002b ). En effet, il a été démontré qu’au moins 4 molécules de Bax peuvent former un pore de 22 Å capable de laisser passer le cytochrome c (Saito et al., 2000). Lors de l’apoptose, il a été démontré que Bax était présent sous forme d’oligomères au niveau de la membrane externe de la mitochondrie et que cette oligomérisation de Bax était nécessaire pour former ce pore (Antonsson et al., 2000).

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

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

Si la mitochondrie joue un rôle certain dans la cytotoxicité de galig, il n’en reste pas moins que le mécanisme d’action des galigines reste encore indéterminé. Les résultats obtenus indiquent l’importance de la mitogaligine dans ce processus de mort. Cependant, on ne peut attribuer la mort cellulaire qu’à la seule production de mitogaligine. Les vecteurs d’expression produisant la mitogaligine mais pas la cytogaligine ne sont pas efficaces pour enclencher la mort. Les mitochondries apparaissent légèrement condensées mais les cellules ne présentent pas les profondes altérations morphologiques typiques de l’expression de galig. La fuite de cytochrome c liée à l’expression de la seule mitogaligine n’est donc pas un critère suffisant pour déclencher le processus de mort. Ce résultat suppose que pour obtenir un effet toxique maximal, il est nécessaire que les deux protéines soient produites. De plus, l’obtention de clones stables produisant uniquement la mitogaligine-EGFP est possible, même si l’expression de la mitogaligine-EGFP ralentit la croissance cellulaire (article, figure 6). Par contre, la sélection de clones produisant à la fois la mitogaligine-EGFP et la cytogaligine s’est toujours révélée négative même lorsque des vecteurs inductibles ont été utilisés. Le
simple fait d’obtenir un niveau basal d’expression lié à la fuite du promoteur apparaît suffisant pour empêcher la croissance des cellules transformées. De même que pour la mitogaligine, la cytogaligine n’est pas suffisante à elle seule pour entraîner la mort cellulaire bien qu’elle soit capable d’entraîner la fuite de cytochrome c de la mitochondrie (figure 48). Il semble que la perméabilisation des mitochondries soit un élément décisif mais, la libération du cytochrome c n’apparaît pas être le seul élément dans l’avènement de la mort induite par le gène galig. Le fait que la cytotoxicité liée à l’expression de galig nécessite les deux protéines pose la question d’une éventuelle interaction entre mitogaligine et cytogaligine. Ceci pourra être étudié par des expériences de co-immunoprécipitation. Un des points essentiels pour comprendre les mécanismes de mort du gène galig sera de déterminer les cibles cellulaires et moléculaires de la cytogaligine. Est-ce que la cytogaligine potentialise directement ou indirectement l’effet de la mitogaligine ou est-ce que les deux galigines fonctionnent de manière indépendante ?

III. La régulation de l’expression du gène galig.

Le locus LGLAS3 est une structure génique complexe. Une portion d’ADN du locus peut être traduite dans 3 cadres de lecture différents. Ce type d’organisation est rare chez les eucaryotes supérieurs. Une structure avoisinant le degré de complexité de galig est également décrite pour le locus INK4a (Quelle et al., 1995). L’existence d’un second transcrit issu d’un promoteur interne a été mis en évidence (Stone et al., 1995). Les transcrits codent les protéines p16INK4a et p19ARF. Les deux ORF sont chevauchantes et décalées au niveau de l’exon 2, les deux protéines traduites sont par conséquent totalement différentes. L’expression de p16INK4a est spécifique, alors que celle de p19ARF est ubiquitaire. Les deux protéines interviennent dans l’arrêt du cycle cellulaire. D’un point de vue évolutif, ces structures géniques complexes identifiées chez les virus et les procaryotes pourraient être considérées, chez les eucaryotes, comme des voies de régulation acquises sous la pression de sélection.

L’expression de galig relève de deux niveaux de régulation différents :

- **Un niveau de régulation transcriptionnel.**

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

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

\textbf{Un niveau de régulation traductionnel.}

Les résultats obtenus avec les anticorps (chapitre 4) puis sur la traduction de la cytogaligine (chapitre 5) indiquent plusieurs possibilités d'initiation de traduction pour la cytogaligine sur le transcrit le plus court (figure 56). Ce transcrit fait apparaître deux sites ATG supplémentaires en amont de celui trouvé dans l'exon 3 qui est utilisé pour initier la traduction de la cytogaligine à partir du transcrit le plus long. L'utilisation de ces codons devrait produire une cytogaligine plus longue de 3 ou 12 acides aminés suivant le codon utilisé (AUG\textsubscript{321,323} ou AUG\textsubscript{348,350}, figure 56). Il reste à déterminer quel codon est utilisé pour initier la production de cette protéine alternative. Les conséquences de la production de ces isoformes de la cytogaligine sur la cytotoxicité devront par la suite être étudiées. Est-ce que la localisation de ces protéines alternatives est identique ou différente de la forme produite à partir du long transcrit ?

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

<table>
<thead>
<tr>
<th>Nom des plasmides</th>
<th>Protéines codées</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>pgalig</td>
<td>Mitogaligine et Cytogaligine</td>
</tr>
<tr>
<td>pMG galig</td>
<td>Mitogaligine</td>
</tr>
<tr>
<td>pCG galig</td>
<td>Cytogaligine</td>
</tr>
<tr>
<td>pORF2-EGFP</td>
<td>Mitogaligine-EGFP et Cytogaligine</td>
</tr>
<tr>
<td>pMG-EGFP</td>
<td>Mitogaligine-EGFP</td>
</tr>
<tr>
<td>pORF1-EGFP</td>
<td>Cytogaligine-EGFP et Mitogaligine</td>
</tr>
<tr>
<td>pCG-EGFP</td>
<td>Cytogaligine-EGFP</td>
</tr>
<tr>
<td>pORF2-DsRED2</td>
<td>Mitogaligine-DsRED2 et Cytogaligine</td>
</tr>
<tr>
<td>pMG-DsRED2</td>
<td>Mitogaligine-DsRED2</td>
</tr>
<tr>
<td>pORF1-DsRED2</td>
<td>Cytogaligine-DsRED2 et Mitogaligine</td>
</tr>
<tr>
<td>pCG-DsRED2</td>
<td>Cytogaligine-DsRED2</td>
</tr>
<tr>
<td>pEGFP N3</td>
<td>EGFP</td>
</tr>
<tr>
<td>pHG3</td>
<td>Galectine-3</td>
</tr>
<tr>
<td>pDsRED2</td>
<td>DsRED2</td>
</tr>
<tr>
<td>pGFP Bcl-XL</td>
<td>Bcl-XL-EGFP</td>
</tr>
<tr>
<td>pGFP Bcl-2</td>
<td>Bcl-2-EGFP</td>
</tr>
<tr>
<td>pBid DsRED2</td>
<td>Bid-DsRED2</td>
</tr>
<tr>
<td>Délétions de la Mitogaligine</td>
<td>Acides aminés 31 à 54 de la mitogaligine en fusion avec</td>
</tr>
<tr>
<td>pMG 31_54 EGFP,</td>
<td>EGFP.</td>
</tr>
</tbody>
</table>

...
BIBLIOGRAPHIE


XMAP215 regulates microtubule dynamics through two distinct domains Control of microtubule dynamics by the antagonistic activities of XMAP215 and XKCM1 in Xenopus egg extracts. *J Cell Biol* 168, 257-269.


RESUME.

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