

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Centre de Biophysique Moléculaire

Équipe « Mort cellulaire programmée »

THÈSE présentée par :

Pauline ROBINET

soutenue le 2 juillet 2010

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université d'Orléans**

Discipline : Biologie Moléculaire et Cellulaire

**La mitogaligine, protéine de la mort cellulaire programmée :
Localisation nucléaire, conséquences de modifications
post-traductionnelles potentielles et interaction
fonctionnelle avec Mcl-1**

THÈSE dirigée par :

Alain LEGRAND

Professeur, Université d'Orléans.

RAPPORTEURS :

Danielle TROUTAUD

Professeur, Université de Limoges.

Pascal GAUDUCHON

Professeur, Directeur du GRECAN, Université de Caen.

JURY :

Ginette DAMBRINE

Directrice de recherche, INRA-Université de Tours.

Danielle TROUTAUD

Professeur, Université de Limoges.

François ERARD

Professeur, Université d'Orléans, Président du jury.

Pascal GAUDUCHON

Professeur, Directeur du GRECAN, Université de Caen.

Alain LEGRAND

Professeur, Université d'Orléans.

Remerciements

Je tiens à remercier Alain Legrand, mon directeur de thèse (et stages Master), pour m'avoir fait confiance et m'avoir acceptée au sein de son équipe « pour raison sociale » (;-)). Tout au long de ces années, tu as su éveiller ma curiosité, dans un premier temps sur la biologie moléculaire de par les cours enseignés, puis par la manière dont tu m'as décrit le sujet de l'équipe. Galig à la vie à la mort ou galig pour la vie. Ta passion pour galig et ta motivation constante pour le sujet m'impressionne ! Tu as toujours été disponible, à l'écoute, attentif à mon moral, bref fait preuve de grandes qualités humaines, ce qui semble rare chez les chefs. Tu m'as également permis de m'épanouir en me laissant libre de prendre des responsabilités universitaires au cours de ma thèse. J'espère sincèrement que l'on retravaillera ensemble.

Je remercie les rapporteurs de cette thèse : Danielle Troutaud et Pascal Gauduchon pour la rapidité avec laquelle vous avez lu mon manuscrit et l'intérêt que vous avez porté à mon travail. J'ai beaucoup apprécié vos rapports et les remarques formulées. Merci également à Ginette Dambrine, pour avoir mis le pied dans l'apoptose. J'espère que vos collaborations avec l'équipe seront fructueuses. Merci à Mr le président du jury, François Erard pour sa bonne humeur et sa touche d'humour qui permet de décompresser dans ce monde stressé.

Je remercie l'ensemble de l'équipe de choc... l'équipe Legrand. Cette équipe est bien plus qu'une équipe classique : c'est un syndicat pour la défense et le respect des valeurs. Sous vos faux airs de misogynes (heureusement Lulu est là), les mots essentiels retenus, vous caractérisant sont justes, humains, droit, respect, disponibles et comiques ! J'ai également beaucoup apprécié le fait de ne ressentir aucune hiérarchie au sein de votre équipe et d'être considérée d'avantage comme une collègue plutôt qu'une simple thésarde ;-).

Martine, je te suis reconnaissante pour la partie technique de ma thèse. Ton sens de la rigueur et de l'ordre au sein du labo m'épatera toujours.

Lucile, merci pour ton coup de pinceau, les vacances, avoir été présente dans les coups durs, les manip FACS et confocale, les TP de bio mol...

Fabienne, merci de m'avoir délégué tes TP de microbio, même si j'aurai préféré que tu me les délégués dans d'autres circonstances... Merci également pour ton soutien moral, nos discussions de maman...

Thierry, même si on a eu quelques différends, je ne te serai jamais assez reconnaissante pour le travail que tu as fourni dans la rédaction de cette thèse, notamment pour l'orthographe ou les espaces de trop et surtout la biblio !

Stéphane et son couteau, mon colloc de bureau : pour ses blagues (j'ai vite compris à qui j'avais à faire), pour avoir tenu sa biblio à jour au cours de cette coupe du monde de foot ;-) et surtout pour son côté critique.

Patrick, merci pour m'avoir formée au western-blot, pour tes aides ...

Monika, pour nos sorties festives, nos sorties roller, nos confidences...

Alexis, tu sais que l'aspirine induit l'apoptose dans les cellules leucémiques ? (Iglesias, 2009). Tu vois, je n'ai qu'une parole ;-) merci pour toutes nos conversations directes ou indirectes, tes écoutes et conseils, manip... pour le fameux titre « Week-end à Rome » Merci Etienne, grâce à toi une grande complicité est née ;-) (ou pas lol).

Je remercie également les stagiaires rencontrés au labo : Emilie, Marie-Laure, Aurélie, Geoffrey, Adelin

Merci aux doctorants, post-doctorants, ingénieurs, techniciens rencontrés :

- La CBM team : Anthony, Loïc, Rémy, Romy, Yann-vai, David
- La Rochelle team : Matthieu, Julien, Paul, Edith, Anthony
- Les membres passés et présents de l'ADSO, pour ces moments de décontraction : Homan, Bibou, Veronica et Remi, Guilhem, Guillaume, Florence...

Merci à la promo « M2 ERGP »: Issa, Baptiste, Romy, William, Erika, Olivier, Laëtitia, Thomas

Je n'oublie pas non plus les autres thésards ou post doctorants avec qui j'ai partagé de très bons moments : Angélique, Ludovic, Mayuresh pour ICARE, Mat, Seb, Manu, Priscille, Jérémie, Marina pour l'ISTO.

Pablo pour les merveilleux moments passés ensemble...

Merci à mon webmaster Johan et sa femme Stéphanie

Merci à Dr Fob pour son soutien

Merci aux collègues biochimistes pour ce premier poste ATER (et le 2^{ème}): Fabienne, Lucile, Chantal, Maryvonne, Alain, Stéphane, Pierre, François, Patrick, Kadija, Arnaud B, Mélanie, Arnaud P et Esmat. Vous m'avez soutenue dans mon projet et permis de gagner en expérience dans l'enseignement, merci pour cette confiance !

Bon sortons un peu du contexte CNRS/Université, je remercie ma famille et tout particulièrement mes parents et mes fils (Hugo 8 ans et Enzo 4 ans) (les âges sont indiqués à la demande de Hugo ;-), mes sources de motivations (et financières), sans qui je n'aurai pu accéder à ce titre.

Mes sœurs : Charlotte, Justine, Hortense

Mamie Denise, comme tu dis « Papi Etienne doit être heureux s'il nous voit de là-haut »

Mamie Ge et Henry

Martine et Philippe, pour leurs relations privilégiées et pour tous les repas de famille organisés, Arlette et Pelo

Mes cousins et cousines...

Mes beaux-parents

Merci à Fred pour son soutien durant les années lycée et fac

Merci à mes amis les plus chers: Aurore et Sad, Laura et Doudou, Malika et Sylvain, Gaëlle et Matthieu, Sy et Romain, Nathalie et Jean-Luc, Marie-Laure et Alex, Anaïs, Chloé et Dan.

Merci à tous pour ce que vous avez fait pour moi.

A Hugo et Enzo

Table des matières

Table des Figures	1
Table des Tableaux	3
Abréviations	5
Introduction générale	9
Généralités	11
I- Etapes clés de l'apoptose	12
1- Phase d'initiation	12
2- Phase de décision	13
2.1- La découverte de Bcl-2 et les membres de la famille Bcl-2	13
2.2- Activités des membres de la famille Bcl-2	14
2.2.1- Les protéines BH3-seulement	14
2.2.2- Les protéines pro-apoptotiques à multi domaines BH	16
2.2.3- Les protéines anti-apoptotiques	16
2.3- Au-delà de la mort : L'implication des membres de la famille Bcl-2 dans des fonctions autres qu'apoptotiques.	17
3- Phase d'exécution	18
3.1- Les différentes voies impliquées dans l'apoptose	18
3.1.1- La voie intrinsèque mitochondriale	18
3.1.2- La voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort	20
3.1.3- Relation entre la voie extrinsèque des récepteurs et la voie intrinsèque mitochondriale.....	21
3.1.4- La voie intrinsèque du réticulum endoplasmique	23
3.1.5- La voie indépendante des caspases	25
3.2- Modifications morphologiques et biochimiques du processus apoptotique	27
3.2.1- Les causes de modifications morphologiques externes	28
3.2.2- Les causes de modifications morphologiques internes	29
4- Phase d'élimination	31
II- Régulation du phénomène apoptotique	32
1- Régulation de l'activité apoptotique par modifications post-traductionnelles	33
1.1- Par addition d'un groupe fonctionnel	33
1.1.1- La phosphorylation	33
1.1.2- Modifications des protéines par les lipides	35
1.2- Par addition de groupes peptidiques ou de protéines	37

1.2.1- L'ubiquitylation.....	37
1.2.2- La sumoylation.....	40
1.3- Par changements structuraux	43
1.3.1- Les ponts disulfures	43
1.3.2- Les clivages protéolytiques	45
1.4- Par changement de la nature chimique des acides aminés : exemple de la citrullination...	46
2- Régulation de l'activité apoptotique par adressage cellulaire et modifications post-traductionnelles	48
3- Régulation des protéines apoptotiques de la famille Bcl-2 par modifications post-traductionnelles.....	50
3.1- Les membres anti-apoptotiques.....	50
3.1.1- Mcl-1.....	51
3.1.2- Bcl-X _L	54
3.1.3- Bcl-2	56
3.2- Les membres pro-apoptotiques à multi-domaines BH de type Bax/Bak.....	57
3.3- Les membres pro-apoptotiques à domaine BH3-seulement	61
3.3.1- Bid	61
3.3.2- Bad.....	63
4- Conclusion : Importance de la connaissance d'une régulation par modifications post-traductionnelles en thérapeutiques	67
 Introduction: Galig et les galigines	 69
I- Galig ou la complexité génique	70
II- Les galigines et la mort cellulaire programmée.....	71
1- Structure	71
2- Fonction cytotoxique des galigines	72
3- Régulation de galig par des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2.....	74
III- Synopsis de ma thèse	75
 Résultats	 77
Partie I	
Localisation nucléaire de la mitogaligine : De l'adressage à la fonction cytotoxique ...	79
Introduction	80
Résultats	81
Chapitre 1 : Activité apoptotique de la mitogaligine nucléaire	82
Article	83

Chapitre 2 : Détermination du signal de localisation nucléaire de la mitogaligine89

Introduction.....	89
Article	91
Conclusions, Discussion et Perspectives	96
• Les signaux de localisation nucléaire « classiques »	96
• Le signal de localisation nucléaire atypique de la mitogaligine	96
• Régulation du transport nucléaire.....	98
• Différence de localisation de la mitogaligine en fonction de la position de la protéine reporteur EGFP.....	99
• La mitogaligine : une protéine contenant deux signaux de localisations intracellulaires différentes	100
• Conclusion.....	101

Partie II

Etude des modifications post-traductionnelles potentielles de la mitogaligine par mutagenèse dirigée..... 103

Introduction	104
Matériels et méthodes	105
Résultats	113

Chapitre 1 : Protéolyse de la mitogaligine mitochondriale.....114

Chapitre 2 : Mutagenèse dirigée du site potentiel de Sumoylation/Ubiquitylation de la mitogaligine116

I- L'inhibiteur spécifique du protéasome MG-132 atténue la protéolyse de la mitogaligine mitochondriale.....	116
II- Mutagenèse dirigée du site potentiel de sumoylation/ubiquitylation	117

Chapitre 3 : Sites potentiels de phosphorylation de la mitogaligine.....120

I- La phosphorylation : une modification post-traductionnelle envisageable dans la régulation de l'activité de la mitogaligine.	121
I.1- Détermination des résidus impliqués dans une phosphorylation potentielle	121
I.2- Détermination des résidus impliqués dans la délocalisation de la mitogaligine	122
I.3- Mimer la phosphorylation des résidus T29/T73 et T38/S39 atténue la protéolyse de la mitogaligine mitochondriale.....	127
I.4- Toxicité des mutants de phosphorylation de la mitogaligine.....	129
II- Autres sites de phosphorylations testés qui n'ont pas de rôle apparent dans l'activité de la mitogaligine	131

Chapitre 4 : Mutation des cystéines de la mitogaligine133

I- Mutation des cystéines de la mitogaligine mitochondriale	133
II- Mutation des cystéines de la mitogaligine nucléaire	134

Conclusions/Discussions/perspectives	137
• Probable régulation de l'activité de la mitogaligine par phosphorylation.....	137
• Trafic mitochondrio-nucléaire de la mitogaligine	137
• Protéolyse de la mitogaligine : une régulation par phosphorylation ?	138
• Mitogaligine mitochondriale et protéasome.....	139
• Mitogaligine et ubiquitinylation	139
• Rôle des cystéines dans la localisation de la mitogaligine.....	140
Partie III	
Régulation du processus apoptotique initié par galig : Interaction avec la protéine anti-apoptotique Mcl-1	143
Introduction	144
Résultats	145
Chapitre 1 : Expression simultanée de galig et Mcl-1.....	146
I- Effets antagonistes de Mcl-1 et galig	146
II- Diminution de l'expression de Mcl-1 endogène dans les cellules transfectées par galig.....	149
Chapitre 2 : Interaction mitogaligine/Mcl-1	152
Conclusions/Discussions/ Perspectives.....	156
• Modèle de régulation de la mitogaligine par Mcl-1	156
• La mitogaligine peut-elle être assimilée aux protéines pro-apoptotiques de type Bak/Bax ?.....	158
• Galig, un espoir thérapeutique ?.....	159
• Galig dans la différenciation cellulaire	159
Conclusion générale	151
Bibliographie.....	165

Table des Figures

Figure 1 : Déroulement en 4 grandes étapes du processus apoptotique	12
Figure 2 : Représentation schématique de la structure des protéines de la famille Bcl-2	14
Figure 3 : Activité apoptotique des membres de la famille Bcl-2	17
Figure 4 : Perméabilisation de la mitochondrie lors d'un processus apoptotique.....	19
Figure 5 : Les différents types de récepteurs impliqués dans la signalisation de l'apoptose	21
Figure 6 : Les voies d'exécution de la mort cellulaire programmée.....	22
Figure 7 : Modèle de régulation de la mort cellulaire induite par les membres de la famille de Bcl-2 au niveau du RE et de la mitochondrie	24
Figure 8 : L'AIF : De sa fonction oxydoréductase à sa fonction apoptotique	26
Figure 9 : Morphologie des cellules Hela en condition physiologique (A) ou soumises à un stimulus apoptotique (B).....	27
Figure 10 : Substrats des caspases impliqués dans les changements morphologiques d'une cellule apoptotique.....	29
Figure 11 : Condensation et fragmentation des noyaux de cellules apoptotiques	30
Figure 12 : Réseau mitochondrial d'une cellule saine (A) ou d'une cellule apoptotique (B)	31
Figure 13 : Protéolyse de la phospholipase A2 indépendante du Ca^{2+} (iPLA ₂) par la caspase-3.....	31
Figure 14 : Les différents niveaux de régulations de l'expression génique	32
Figure 15 : Fonction anti-apoptotique de la voie PI3K/PKB : Exemple de Bax	34
Figure 16 : Acylation par des acides gras et prénylation des protéines	36
Figure 17 : Régulation de la mort cellulaire programmée par le système ubiquitine-protéasome	40
Figure 18 : Rôles d'une sumoylation dans une cellule eucaryote.....	41
Figure 19 : Compétition sumoylation/ubiquitinylation : Exemple de NF- κ B	43
Figure 20 : Citrullination de protéines dans une cellule apoptotique.....	48
Figure 21 : Représentation schématique de la structure de PARP-1 et de l'AIF.....	49
Figure 22 : Régulation de la stabilisation de Mcl-1 par GSK3.....	53
Figure 23 : Désamidation de Bcl-X _L dans une cellule apoptotique	55
Figure 24 : Modèle de régulation de Bax induite par sa phosphorylation par JNK et p38 MAPK	59
Figure 25 : Régulation de Bax par les espèces réactives de l'oxygène (ROS).....	60
Figure 26 : Modèle de régulations post-traductionnelles de Bid	63
Figure 27 : Régulation post-traductionnelle de Bad	64
Figure 28 : Galig, un gène interne au gène de la galectine-3	70
Figure 29 : Séquence primaire des galigines	71
Figure 30 : La transfection de l'ADNc de galig dans des cellules en culture induit une condensation des mitochondries et la mort cellulaire	73
Figure 31 : Localisation nucléaire et mitochondriale de la mitogaligine	80
Figure 32 : Principe de la mutagenèse dirigée « Quickchange® multi-site directed mutagenesis » (Stratagene)	106
Figure 33 : La mitogaligine : une différence de taille en fonction de la localisation cellulaire.....	115
Figure 34 : MG-132, un inhibiteur spécifique du protéasome, stabilise la mitogaligine	117
Figure 35 : Effet de la mutation du site potentiel de sumoylation/ubiquitinylation sur la localisation de la mitogaligine	118
Figure 36 : Expression de la mitogaligine en fonction de la mutation du site potentiel de sumoylation/ubiquitinylation	119

Figure 37 : Les mutations des Thr 29, Thr 38, Ser 39, Thr 62 et Thr 73 en Asp délocalisent la mitogaligine-EGFP des mitochondries	121
Figure 38 : La double mutation des Thr 38 et Ser 39 en Asp délocalise la mitogaligine-EGFP des mitochondries	124
Figure 39 : Perte de localisation mitochondriale de la mitogaligine-EGFP mutée sur les Thr 38 et Ser 39.....	125
Figure 40 : La mitogaligine mutée sur les Thr 29 et Thr 73 en Asp conserve une localisation mitochondriale.....	126
Figure 41 : La double mutation T29 et T73 en Asp augmente l'efficacité de transfection et/ou diminue la toxicité cellulaire.....	127
Figure 42 : Les couples de mutation T29T73D et T38S39D diminuent la protéolyse de la mitogaligine-EGFP	128
Figure 43 : La mitogaligine-EGFP conserve son caractère instable quand les couples de mutations T29T73 et T38S39 sont mutés en Ala	129
Figure 44 : Les mutations des sites potentiels de phosphorylation T29 et T73 diminuent la toxicité cellulaire induite par galig.....	130
Figure 45 : Autres sites potentiels de phosphorylation testés, n'ayant pas de rôle apparent dans la fonction de la mitogaligine-EGFP	132
Figure 46 : Les autres sites potentiels de phosphorylation n'ont pas de rôle apparent dans la protéolyse de la mitogaligine-EGFP.....	132
Figure 47 : Mutation des cystéines de la mitogaligine-EGFP et localisation cellulaire.....	134
Figure 48 : Localisation nucléaire de l'EGFP-mitogaligine mutée sur ses 6 Cys	135
Figure 49 : Expression de l'EGFP-mitogaligine lorsque toutes ses Cys sont mutées en Ser	135
Figure 50 : Mcl-1 s'oppose à l'effet toxique induit par galig.....	148
Figure 51 : La surexpression de Mcl-1 autorise l'expression de galig dans la cellule.....	149
Figure 52 : Galig diminue l'expression de Mcl-1 endogène	151
Figure 53 : Principe et protocole de la co-immunoprécipitation des galigines avec Mcl-1	153
Figure 54 : Expériences de co-immunoprécipitation entre la mitogaligine et Mcl-1.....	155
Figure 55 : Modèle de régulation de la mitogaligine par ses phosphorylations potentielles	157
Figure 56 : Modèle de régulation de la mitogaligine par les membres anti-apoptotiques Mcl-1 et Bcl-X _L	158

Table des Tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques des différents types de mort cellulaire.....	11
Tableau 2 : Un même site pour différentes kinases : multiples voies de régulations possibles pour Bad (protéine murine)	65
Tableau 3 : Caractéristiques biochimiques des galigines	72
Tableau 4 : Sites de modifications post-traductionnelles de la mitogaligine prédits par bioinformatique	104
Tableau 5 : Amorces contenant les sites mutés pour la mutagenèse dirigée des vecteurs étudiés dans les modifications post-traductionnelles potentielles (MPT) de la mitogaligine	105
Tableau 6 : Caractéristiques des transfections.....	108
Tableau 7 : Anticorps utilisés en immunofluorescence pour l'étude des modifications post-traductionnelles potentielles de la mitogaligine	109
Tableau 8 : Anticorps utilisés en western-blot pour l'étude des modifications post-traductionnelles potentielles de la mitogaligine	111
Tableau 9 : Plasmides utilisés pour l'étude de la protéolyse de la mitogaligine	114
Tableau 10 : Plasmides utilisés pour l'étude de la protéolyse de la mitogaligine en présence de MG-132.....	116
Tableau 11 : Vecteurs transfectés pour l'étude de la mutation du site potentiel de sumoylation/ubiquitinylation de la mitogaligine	118
Tableau 12 : Sites potentiels de phosphorylation de la mitogaligine prédits par programmes bioinformatiques	120
Tableau 13 : Plasmides construits pour l'étude de la phosphorylation potentielle de la mitogaligine	121
Tableau 14 : Plasmides construits pour étudier les résidus impliqués dans la délocalisation de la mitogaligine.....	122
Tableau 15 : Autres vecteurs pour l'étude de la phosphorylation potentielle de la mitogaligine	131
Tableau 16 : Plasmides construits pour étudier l'effet de la mutation des cystéines sur la localisation de la mitogaligine	133
Tableau 17 : Plasmides construits pour étudier l'effet de la mutation des cystéines sur la localisation de la mitogaligine	134
Tableau 18 : Plasmides utilisés pour étudier les effets antagonistes de Mcl-1 et galig.....	146
Tableau 19 : Anticorps utilisés en western-blot pour l'étude de l'expression des galigines en présence de Mcl-1	147
Tableau 20 : Plasmides utilisés pour étudier l'expression endogène de Mcl-1	149
Tableau 21 : Anticorps utilisés en western-blot pour étudier l'expression de Mcl-1 endogène	150
Tableau 22 : Plasmides utilisés pour l'étude de l'interaction galigines/Mcl-1	152
Tableau 23 : Caractéristiques morphologiques et biochimiques de la mort cellulaire induite par la mitogaligine en fonction de sa localisation intracellulaire.	161

Abréviations

ADN : Acide **D**ésoxyribo**N**ucléique
ADNc : Acide **D**ésoxyribo**N**ucléique complémentaire
AIF : Apoptosis-**I**nducing **F**actor
Ala : **A**lanine
Arg : **A**rginine
ARN : Acide **R**ibo**N**ucléique
ARNm : **A**RN messenger
Asp : **A**spartate
ATM/ATR : Ataxia-Telangiectasia-**M**utated/**ATM**-**R**elated
ATP : Adenosine **T**ri-**P**hosphate

Bad : Bcl-x_L/Bcl-2 associated death
Bak : Bcl-2 antagonist killer
Bax : Bcl-2 antagonist **X**
Bcl-2 : **B** cell lymphoma **2**
Bcl-X_L : Bcl-2 homologue **X**_{Long}
Bcl-w : Bcl2L2 = Bcl2-like 2
Bcl-X_S : Bcl-2 homologue **X**_{Short}
BCNU : 1,3-Bis(2-Chloroethyl)-1-NitrosoUrea
BET : Bromure d'**E**Thidium
BH : Bcl-2 Homology region
Bid : BH3 interacting domain death agonist
Bik : BCL2-interacting killer
Bim : Bcl-2 interacting mediator
Bim EL : Bim Extra Long
BP : Band-Pass

C : localisation Cytosolique
[Ca²⁺]_c : **C**oncentration en **c**alcium cytosolique
[Ca²⁺]_{RE} : **C**oncentration en **c**alcium dans le **R**E
CAD : Caspase-Activated Deoxyribonuclease
Caspases : Cysteiny l **a**spartate proteases
Cdc2 : Cell division control protein 2
Cdk 1 : Cyclin-dependent kinase 1
CIAP : Cellular inhibitor of **A**poptosis
CKII : Casein **K**inase **I**I
CMV : Cyto**M**egalo**V**irus
Cys : Cystéine

Da : Dalton
DAPI : 4',6'-Di**A**midino-2-**P**hényl**I**ndole
DD : Death **D**omain
DED : Death Effector **D**omain
DIABLO : Direct **I**AP **B**inding protein with **L**Ow pI
DISC : Death Inducing Signaling **C**omplex
DMEM : Dulbecco's **M**odified **E**agle **M**edium
DMSO : Di**M**éthyl Sulf**O**xyde
dNTP : désoxyriboNucléoside **T**ri**P**hosphate
DTT : Di**T**hio**T**réitol

EBV : Epstein-**B**arr **V**irus
ECL : Enhanced Chemi**L**uminescent
EDTA : Ethylene **D**iamine **T**etra-**A**cetate
EGFP : Enhanced **G**reen **F**luorescent **P**rotein
eIF4E : eukaryotic translation **I**nitiation **F**actor **4E**
E-MEM : Eagle's **M**inimum **E**ssential **M**edium
EndoG : **E**ndonuclease **G**

Abréviations

ERK : Extracellular signal-Regulated Kinases

ExPASy : Expert Protein Analysis System

FADD : Fas-Associated Death Domain

FACS : Fluorescence Activated Cell Sorting

FAS-R : FAS-Récepteur

FAS-L : FAS-Ligand

FITC : Fluorescein IsoThioCyanate

FKK : Phenylalanine (F)-Lysine (K)-Lysine (K)

FLIP : FLICE-Like Inhibitory Protein

FT : Facteur de Transcription

GALIG : GALectin-3 Internal Gene

GFP : Green Fluorescent Protein

Glu : Glutamate

Gly : Glycine

GSK3 : Glycogene Synthase Kinase

h : heure

HeLa : Henrietta Lacks

HEPES : acide 4-(2-HydroxyEthyl)-1-Pipérazine Ethane Sulfonique

HPV : Human Papilloma Virus

HRP : HorseRadish Peroxidase

HSP70 : Heat Shock Protein 70

HtrA2 : High-temperature requirement protein A2

IAP : Inhibitor of Apoptosis Protein

ICAD : Inhibitor of Caspase-Activated Deoxyribonuclease

ICE : Interleukin-1 beta-Converting Enzyme

IκB : Inhibitor of kappa B

IKK : IκB Kinase

IL-3 : InterLeukin 3

IMM : Inner Mitochondrial Membrane

IMS : InterMembrane Space

IP : ImmunoPrécipitation

IP3 : Inositol 1,4,5 triPhosphate

IP3-R : Récepteur à l'IP3

iPLA₂ : calcium-independent PhosphoLipase A₂

J : Jour

JAK : JAnus Kinase

JNK : c-Jun N-terminal Kinase

kDa : kilo-Dalton

kb : kilo-bases

kpb : kilo-paires de bases

LB : Luria Bertani

LC3 : Marqueur d'autophagosome

Leu : Leucine

Luc : Luciferase

Lys : Lysine

mM : milliMolaire

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase

MARCKS : Myristoylated Alanine-Rich C-Kinase Substrate

Mcl-1 : Myeloid cell leukemia sequence 1

Mdm2 : Mouse double minute 2

MEKK : Mitogen ERK Kinase Kinase

MEM : Minimum Essential Medium

MOMP : Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization

MG : MitoGaligine

Abréviations

MLS : Mitochondrial Localization Signal
mtPTP : mitochondrial Permeability Transition Pore
MST1 : Mammalian STerile-20-like kinase 1
MTT : 3-(4,5-diMethylThiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium bromide
MW : Molecular Weight

N : localization Nucléaire
NAD : Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NDSM : Negatively charged amino acid-Dependent Sumoylation Motif
NF-κB : Nuclear Factor- κappa B
NHE-1 : sodium/Hydrogen Exchanger 1
NLS : Nuclear Localisation Signal
NPC : Nuclear Pore Complex
Noxa : Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 (Latin for damage)

ORF : Open Reading Frame
OMM : Outer Mitochondrial Membrane

p38K : p38 Kinase
p62^{LCK} : p62 LeucoCyte-specific protein tyrosine Kinase
PAD : PeptidylArginine Deiminase
PAF : Platelet Activating Factor
PAK : P21-Activated Kinase
PAR : Poly-(ADP Ribose)
PARP : Poly-(ADP Ribose) Polymerase
pb : paire de bases
PBS : Phosphate Buffer Saline
PCR : Polymerase Chain Reaction
PDI : Protein Disulfide Isomerase
PDSM : Phosphorylation Dependent Sumoylation Motif
PEI : PolyEthylenImine
PEST : proline (P), glutamic acid (E), serine (S) and threonine (T)
PFA : ParaFormAldehyde
PI3K : Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase
PKB : Protein Kinase B
PKC : Protein Kinase C
PMA : Phorbol 12 β-Myristate 13 α-Acétate
PTP : Permeability Transition Pore
Pro : Proline

RE : Réticulum Endoplasmique
RER : Réticulum Endoplasmique Rugueux
RLU : Relative Light Unit
RMN : Résonnance Magnétique Nucléaire
RNase : RiboNucléase
ROS : Reactive Oxygen Species
RSK : Ribosomal S6 Kinase
RT-PCR : Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
RU : Repetition Unit

SAPKs : Stress Activated MAP kinases
SDS : Sodium DodecylSulfate
SDS-PAGE : SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SENPs : SENtrin-specific Proteases
Ser : Serine
SIDA : Syndrome d'ImmunoDéfiscience Acquise
Smac : Second mitochondria-derived activator of caspases
SR : protéine riche en Sérine (S) et Arginine (R)
SRE : Site de Restriction Enzymatique
SREBP-1A : Sterol Regulatory Element Binding Protein-1A
SRK : S locus Receptor Kinase

Abréviations

STAT : Signal Transducer and **A**ctivator of **T**ranscription

SUMO : Small Ubiquitin-like **M**odifier protein

SVF : Sérum de **V**eau **F**œtal

SV40T-Ag : Simian **V**irus **40** large **T**-Antigen

TBE : Tris **B**orate **E**DTA

tBid : truncated **BH3** interacting **d**omain death agonist

t-Bid C : fragment **C**-terminal de **tBid**

t-Bid N : fragment **N**-terminal de **tBid**

TBS : Tris-**B**uffered **S**aline

TE : Tris **E**DTA

Thr : **T**hréonine

TIM : Translocase of the **I**nnner **M**embrane

TNC : Trafic **N**ucléo-**C**ytoplasmique

TNF : Tumor **N**ecrosis **F**actor

TNF-R : Tumor **N**ecrosis **F**actor **R**eceptor

TOM : Translocase of the **O**uter **M**embrane

TPA : Tetradecanoyl **P**horbol **A**cetate

TRADD : **T**NF **R**eceptor-**A**ssociated **D**eath **D**omain

TRAIL : **T**NF-**R**elated-**A**ppoptosis-**I**nducing-**L**igand

Tris : **tri**-(hydroxymethyl) aminomethane

TRN-SR : **T**Ransporti**N**-**S**R

TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick **E**nd **L**abeling

UCHs : Ubiquitin **C**-terminal **H**ydrolases

USA : United **S**tate of **A**merica

USP : Ubiquitin **S**pecific **P**eptidase

UV : Ultra-**V**iolet

VDAC : Voltage-**D**ependent **A**nion **C**hannel

XIAP : X-linked **I**nhibitor of **A**ppoptosis **P**rotein

zVAD-fmk : N-Benzoyloxycarbonyl-**V**(Val)-**A**(Ala)-**D**(Asp)-fluoromethylketone

zfMcl-1 : zebrafish **M**cl-1

Introduction générale

La mort cellulaire programmée ou apoptose est un des systèmes par lequel des cellules enclenchent leur processus de mort. Le terme apoptose, du grec apoptosis est une expression faisant référence à la chute des feuilles des arbres en automne. Ce terme avait déjà été employé en médecine par Hippocrate de Kos (460-377 avant Jésus-Christ) dans son Traité des instruments de réduction pour décrire la décomposition des tissus après la mort (« chute des os ») (Grammaticos et Diamantis, 2008). En 1885, Walther Flemming, cytologiste allemand, remarque que la destruction d'une cellule n'est pas forcément liée à son usure ni à une agression de l'environnement et qu'elle est capable de s'autodétruire (Clarke et Clarke, 1996). L'apoptose a ensuite été décrite, en 1972 par John Kerr, Andrew Wyllie et Alastair Curie comme un phénomène de mort cellulaire naturelle (Kerr, Wyllie, Currie, 1972).

Effectivement, la mort cellulaire n'est pas antinomique de la vie mais bien souvent nécessaire et consubstantielle de celle-ci comme l'écrit Miguel de Cervantès, dramaturge espagnol, « Tout est bon dans la vie, même la mort ». Ainsi, la mort cellulaire programmée est impliquée dans le développement embryonnaire, fœtal et adulte, l'homéostasie cellulaire, l'immunité, l'élimination de cellules dangereuses pour l'organisme (Jacobson *et al*, 1997 ; Yuan et Yankner, 2000 ; Michael et Oren, 2003), mais également dans la différenciation cellulaire (Sordet *et al*, 2002).

La mort cellulaire programmée est active, génétiquement contrôlée et s'oppose à la prolifération cellulaire. Ces deux processus sont en équilibre constant à l'état physiologique. Un déséquilibre, que ce soit en faveur de la mort ou en faveur de la prolifération a été décrit dans de nombreux cas pathologiques. A titre d'exemples, les cancers et certaines maladies auto-immunes présentent des défauts d'apoptose. Les cellules cancéreuses échappent ainsi à la mort cellulaire et acquièrent une capacité à survivre. Certaines maladies auto-immunes (arthrites, scléroses en plaques, etc.) sont le résultat d'une hyperactivité du système immunitaire due à un défaut d'apoptose de cellules immunitaires, qui de façon anormale, prennent pour cible les cellules saines de l'organisme. Au contraire, une sur-activation de l'apoptose est observée dans d'autres pathologies. C'est le cas des maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson), des ischémies (infarctus du myocarde, accidents vasculaires cérébraux), des désordres immunitaires (SIDA, diabète) (Elmore, 2007).

La mort cellulaire programmée est donc centrale dans le destin des cellules, voir fondamentale à la vie puisqu'une dérégulation conduit à des pathologies bien souvent fatales. On peut alors imaginer combien la régulation de la mort cellulaire programmée est importante et complexe. La compréhension des mécanismes moléculaires du phénomène apoptotique, à savoir les gènes de mort, les gènes de survie, les récepteurs de surface, et les voies de signalisation, va permettre de développer des stratégies pour réguler la survie ou la mort des cellules.

La thématique de ma thèse porte sur l'étude d'un gène cytotoxique, inducteur de la mort cellulaire, caractérisé au laboratoire. Ce gène est un gène interne au gène de la galectine-3

humaine et est nommé galig (*Galectin-3 Internal Gene*). En plus de cette complexité génique, galig présente la capacité rare, chez les eucaryotes, de produire deux protéines différentes à partir d'un seul ARNm. La production de ces deux protéines, appelées galigines (mitogaligine et cytogaligine), enclenche la mort cellulaire programmée (Duneau *et al* 2005). Ces deux protéines sont donc considérées comme des facteurs pro-apoptotiques.

Au cours de cette thèse, j'ai étudié les mécanismes d'action de la mitogaligine ainsi que sa régulation dans la mort cellulaire programmée. La mitogaligine a été initialement décrite comme étant une protéine mitochondriale. La première partie des résultats que je présente montre qu'elle peut également être adressée au noyau. Cette forme nucléaire, dont nous avons étudié le signal de localisation, s'est avérée également extrêmement toxique pour la cellule. La seconde partie des résultats concerne la régulation de l'activité de la mitogaligine et ce à deux niveaux : *via* des modifications post-traductionnelles et *via* l'expression de la protéine anti-apoptotique, Mcl-1. Au niveau des modifications post-traductionnelles, la phosphorylation pourrait jouer un rôle essentiel dans l'activité de la mitogaligine en modulant sa protéolyse mais aussi sa localisation intracellulaire et sa toxicité. Quant aux régulations impliquant Mcl-1, nous avons pu montrer que la mort cellulaire initiée par le gène galig est fortement diminuée après surexpression de Mcl-1. De même, l'expression du gène galig diminue sensiblement l'expression de Mcl-1 endogène. La mitogaligine et Mcl-1 semblent donc impliquées dans une voie apoptotique commune.

L'exposé de l'ensemble de ces résultats est précédée d'une partie intitulée « Généralités sur l'apoptose » au cours de laquelle sont présentés les différentes phases de l'apoptose, les acteurs intervenant dans le déclenchement de l'apoptose ainsi que quelques mécanismes de régulation des processus apoptotiques par modifications post-traductionnelles.

Généralités

Dans les années 1980, deux formes majeures de mort cellulaire, appelées nécrose et apoptose étaient décrites (Walker *et al*, 1988 ; Searle *et al*, 1982). La nécrose correspond à une mort accidentelle de la cellule suite à un dommage de type traumatique (Searle *et al*, 1982 ; Wyllie, 1987). Dans ce processus, la cellule gonfle puis éclate, libérant son contenu cellulaire dans son environnement. Cette libération provoque une inflammation du tissu environnant, ce qui implique l'intervention du système immunitaire (Taylor *et al*, 2008). Au début qualifiée de passive, il semble néanmoins que cette mort soit régulée par diverses voies de transduction du signal (Festjens *et al*, 2006). L'apoptose, quant à elle, se caractérise comme une mort active, génétiquement programmée, nécessaire à la survie des organismes. Dans ce type de mort cellulaire, les cellules s'autodétruisent sans provoquer de phénomène inflammatoire (Singh et Anand, 1995). Entre ces deux représentations opposées de mort cellulaire, il en existe une multitude d'autres partageant certaines caractéristiques apoptotiques et nécrotiques (Lemasters *et al*, 2002 ; Okada et Mak, 2004 ; Kroemer *et al*, 2009). Les caractéristiques des différents types de mort cellulaire sont regroupées dans le tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1 : Caractéristiques des différents types de mort cellulaire

Nd : Non documenté

LC3 : marqueur des autophagosomes

Adapté de Okada et Mak, 2004 ; Kroemer *et al*, 2009

Type de mort cellulaire	Noyau	Membrane cellulaire	Cytoplasme	Caractéristiques biochimiques
Apoptose	Condensation de la chromatine Fragmentation nucléaire ADN en échelle (pas indispensable)	Bourgeonnement Rétraction des pseudopodes Exposition de phosphatidylsérine sur la face externe Reconnaissance et dégradation par des phagocytes	Fragmentation et formation de corps apoptotiques Pas ou peu de modifications d'organites intracellulaires	Dépendant des caspases (pas indispensable) Activation de membres de la famille Bcl-2 Perméabilisation de la membrane mitochondriale Besoin d'ATP Surproduction de ROS
Autophagie	Condensation partielle de la chromatine Pas d'ADN en échelle	Bourgeonnement Peu ou pas de dégradation par des phagocytes	Séquestration du matériel cytoplasmique dans des autophagosomes Augmentation du nombre des lysosomes, des mitochondries	Augmentation de l'activité lysosomale Indépendant des caspases Dissociation Beclin1/Bcl-2 ou Beclin1/Bcl-X _L Conversion LC3-I en LC3-II Dégradation p62 ^{Lsk}
Cornification	Perte du noyau	Modifications de l'architecture (jonctions)	Élimination d'organites cytoplasmiques Accumulation de lipides dans des granules Extrusion de lipides dans l'espace extracellulaire	Expression de transglutaminases ainsi que de leurs substrats Production de kératine
Nécrose	Condensation modérée de la chromatine Agréation et dégradation aléatoire de l'ADN	Gonflement et rupture	Augmentation de la vacuolisation Gonflement des organites intracellulaires Lyse complète	Pas d'inhibiteurs connus Perte de l'homéostasie ionique Activation de calpaïnes et cathepsines Baisse d'ATP Surproduction de ROS Phosphorylation et ubiquitinylation de RIP1
Paraptose	Condensation partielle de la chromatine Pas de fragmentation nucléaire Pas d'ADN en échelle	Pas de bourgeonnement	Augmentation de la vacuolisation	Pas d'inhibition par les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 Indépendant des caspases
Mort cellulaire en métaphase	Fragmentation nucléaire Multiples micro-noyaux	Nd	Nd	Indépendant des caspases Activation anormale de CDK1/cycline B
Sénece	Structure hétérochromatique caractéristique	Nd	Aplatissement Augmentation de la granularité	Activité β -galactosidase Indépendant des caspases

Généralités

Les différentes phases de l'apoptose

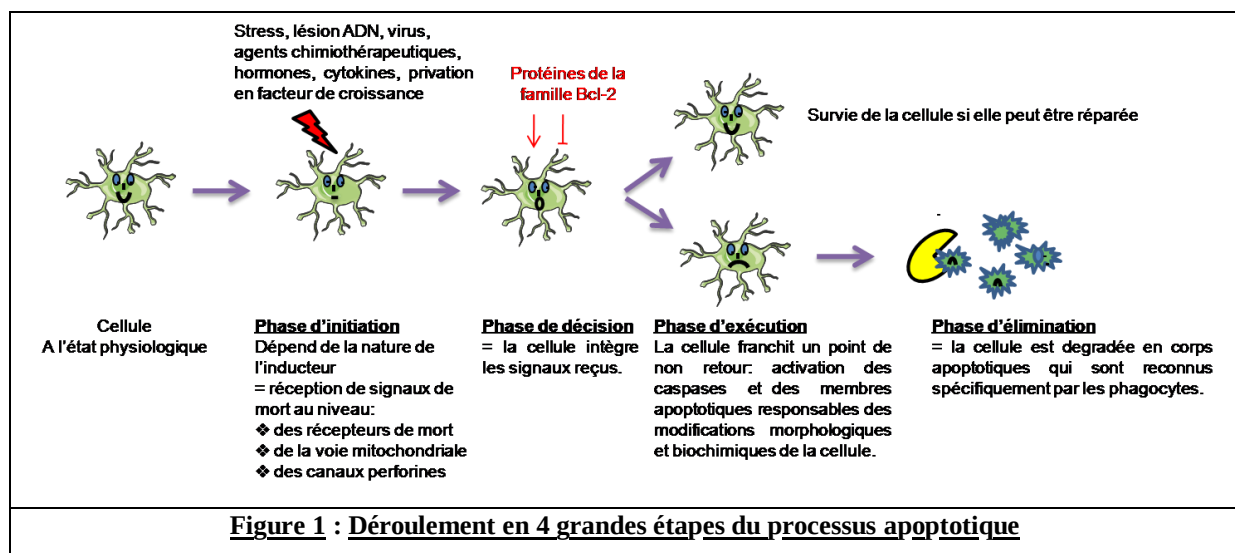
Il convient néanmoins de noter une certaine variabilité biochimique et fonctionnelle à l'intérieur même de chaque type de mort. A titre d'exemple, il existe plusieurs sous-types d'apoptose, qui malgré des apparences morphologiques similaires, conduisent à la mort des cellules *via* des voies biochimiques différentes (Kroemer *et al*, 2009).

D'autres formes particulières de mort cellulaire telles l'excitotoxicité, la dégénérescence wallerienne, la pyroptose, la pyronécrose, l'entose, ont été décrites par Kroemer et collaborateurs dans leurs recommandations sur la classification des différentes morts cellulaires décrites (*Nomenclature Committee on Cell Death*) (Kroemer *et al*, 2009).

Dans la suite de ce manuscrit, nous nous intéresserons uniquement à la mort cellulaire programmée de type apoptose.

I- Etapes clés de l'apoptose

La chronologie des processus apoptotiques peut être divisée en quatre grandes phases résumées dans la Figure 1 (Duvall et Wyllie, 1986).



1- Phase d'initiation

C'est la phase d'induction de l'apoptose. Même si l'apoptose est un phénomène intrinsèque à la cellule, il peut être régulé par des facteurs environnementaux tels que des facteurs de croissance, des récepteurs de surface cellulaire ou des hormones (Katsumi Eguchi, 2001) et/ou des facteurs cellulaires, principalement mitochondriaux (Lu *et al*, 2007). L'apoptose peut être induite de plusieurs façons différentes : une voie extrinsèque comprenant l'activation de récepteurs membranaires ou du Granzyme B, et une voie intrinsèque ou voie mitochondriale (Taylor *et al*, 2008).

2- Phase de décision

La phase de décision, durant laquelle la cellule intègre les signaux de mort reçus, est régulée par les membres de la famille de Bcl-2.

2.1- La découverte de Bcl-2 et les membres de la famille Bcl-2

Bcl-2 a été identifiée chez l'homme à partir d'une translocation t(14/18) dans le locus des chaînes lourdes des immunoglobulines conduisant à une l'expression constitutive de Bcl-2 (Bakhshi *et al*, 1985). Cette surexpression de Bcl-2 bloque la mort des cellules B, à l'origine des lymphomes folliculaires de type B, mettant ainsi en évidence l'effet oncogénique de cette protéine (Tsujimoto *et al*, 1985). Bcl-2 est un oncogène particulier qui a la caractéristique de prolonger la survie cellulaire des cellules hématopoïétiques privées d'IL-3 plutôt que de stimuler la prolifération cellulaire (Vaux *et al*, 1988). Depuis, il a été montré que Bcl-2 pouvait prévenir la mort cellulaire induite par de nombreux stimuli, suggérant l'implication de cette protéine dans de nombreuses voies régulatrices de mort cellulaire programmée (Tsujimoto, 1989 ; Nuñez *et al*, 1990).

Bcl-2 présente 4 domaines caractéristiques nommés BH1 à BH4 pour « Bcl-2 Homology domain ». Chaque protéine identifiée par la suite avec un ou plusieurs de ces domaines d'homologie a été assimilée comme membre de la famille Bcl-2. La figure 2 regroupe les principaux membres de la famille Bcl-2 ainsi que le ou les domaines BH en commun (Danial, 2009). Ces membres peuvent être anti-apoptotiques, favorisant la survie de la cellule ou pro-apoptotiques, induisant la mort de la cellule. En fonction de leur activité apoptotique et de leurs domaines d'homologie, ces protéines ont été classées en 3 sous-familles (Figure 2):



Les protéines anti-apoptotiques à multi domaines BH (Bcl-2 et Mcl-1)

Les domaines BH1, BH2 et BH3 forment un sillon hydrophobe dans lequel le domaine BH3 d'une protéine peut venir se fixer (Sattler *et al*, 1997).



Les protéines pro-apoptotiques à multi domaines BH (Bax et Bak)

Les domaines BH1 et BH2 de ces protéines permettent de former des homodimères et des hétérodimères (Yin *et al*, 1994).



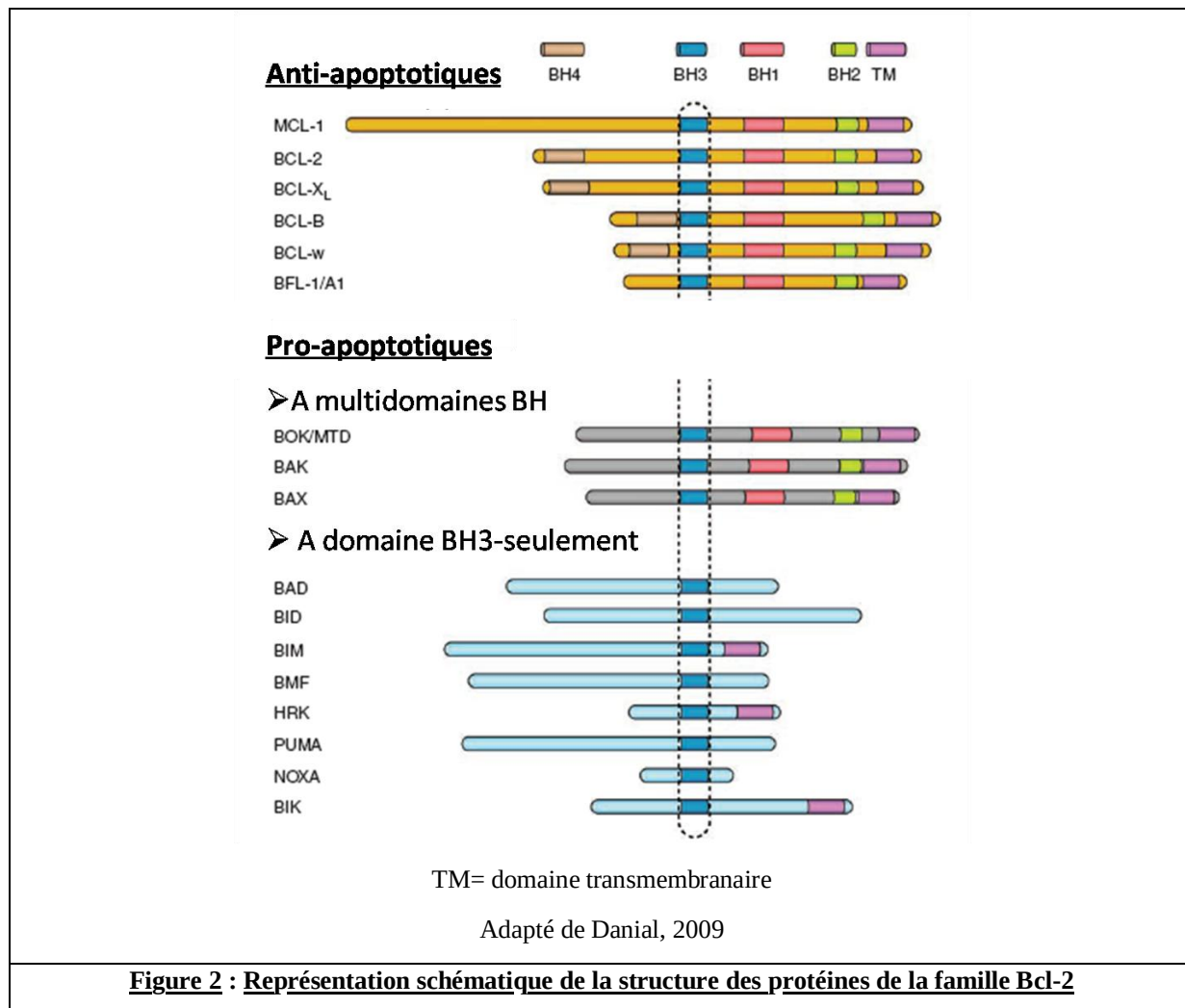
Les protéines pro-apoptotiques à domaine BH3-seulement (Bad, Bid, Bim, Noxa, Puma).

Le domaine BH3 forme une hélice alpha permettant d'interagir avec le sillon hydrophobe des membres anti-apoptotiques. Seul le domaine BH3 des protéines pro-apoptotiques est nécessaire pour interagir avec d'autres protéines pro ou anti-apoptotiques alors que les protéines anti-apoptotiques requièrent la présence des 3 domaines BH1, BH2 et BH3 (Clohessy *et al*, 2006).

Les protéines de la famille Bcl-2 sont cytosoliques mais la plupart possède un domaine C-terminal hydrophobe leur permettant de s'insérer dans les membranes d'organites, principalement mitochondries, réticulum endoplasmique et noyau (Krajewski *et al*, 1993).

Généralités – Etapes clés de la mort cellulaire programmée

Phase de décision : les protéines de la famille Bcl-2



2.2- Activités des membres de la famille Bcl-2

Les membres de la famille Bcl-2 sont de puissants régulateurs de l'apoptose. Ils contrôlent la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale.

2.2.1- Les protéines BH3-seulement

Les protéines BH3-seulement sont des protéines à durée de vie longue. Elles sont constamment présentes dans la cellule mais sous une forme latente (Puthalakath et Stasser, 2002). La voie intrinsèque mitochondriale débute avec l'induction par des facteurs de transcription et/ou l'activation post-traductionnelle des protéines BH3-seulement (Youle et Strasser, 2008). Elles intègrent les signaux apoptotiques provenant des différents compartiments cellulaires et les transmettent aux membres pro-apoptotiques à multi domaines BH en régulant leur activité (Opferman et Korsmeyer, 2003). Le domaine BH3 consiste en une séquence de 9 à 16 acides aminés dont 7 forment le cœur actif de BH3. La séquence consensus de ce cœur est LXXXGDE où X représente n'importe quel acide aminé (Lanave *et al*, 2004). Cette séquence n'est pas strictement conservée dans les différentes protéines BH3-seulement et il semble que les acides aminés essentiels pour une interaction

avec les membres anti-apoptotiques soient la leucine et l'aspartate (Day *et al*, 2008). Les différents profils de domaine BH3 montrent la spécificité d'interaction de certains membres pro-apoptotiques vis-à-vis des membres anti-apoptotiques et des mutations dans ces domaines BH3 modifient leur préférence d'interaction. Par exemple Bad se lie préférentiellement à Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W, Bid et Bik à Bcl-X_L, Bcl-W et A1 alors que Noxa a une affinité plus grande pour Mcl-1 et A1. Cette spécificité est également valable pour les interactions avec les membres pro-apoptotiques à multi domaines BH et peu d'entre eux (Bid, Bim et Puma) peuvent se lier directement à Bax et Bak (Lomonosova et Chinnadurai, 2008).

Certaines protéines BH3-seulement peuvent interagir avec des membres pro et anti-apoptotiques, alors que d'autres (Bad) interagissent et neutralisent seulement des partenaires anti-apoptotiques (Letai *et al*, 2002 ; Chen *et al*, 2005 ; Kuwana *et al*, 2005 ; Walensky *et al*, 2006 ; Billen *et al*, 2008 ; Gavathiotis *et al*, 2008) (Figure 3).

Les protéines à domaine BH3 peuvent être distinguées en deux sous-groupes en fonction de leur activité directe ou indirecte dans l'activation du processus apoptotique. Les protéines à domaine BH3-seulement dites activatrices se lient aux protéines pro-apoptotiques à multi domaines BH pour les activer (tBid, Bim, Puma) alors que les protéines à domaine BH3-seulement dites facilitatrices se lient aux membres anti-apoptotiques pour les inhiber (Bad, Bik, Noxa) (Strasser, 2005). Le mode d'action des protéines BH3-seulement reste très controversé. Dans un premier modèle, l'activation de Bak et Bax, par changement conformationnel, résulte d'une interaction directe de tBid, Bim et Puma (Youle, 2007). Dans le second modèle, Bak est activée lorsqu'elle est dissociée de Bcl-X_L et Mcl-1, par activation et interaction directe entre les protéines BH3-seulement et les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Willis *et al*, 2007). Ce dernier modèle ne coïncide cependant pas avec l'activation de Bax, qui existe dans un état monomérique dans le cytosol d'une cellule saine. Ceci dit, à l'origine, Bax a été initialement découvert complexée avec Bcl-2 (Oltvai *et al*, 1993). Son activation ne dépendrait donc pas uniquement d'une dissociation avec une protéine anti-apoptotique. De plus, Bad ne peut pas interagir avec Bax et Bak, Bad requiert donc une protéine BH3-seulement supplémentaire pour induire l'apoptose, ce qui est en faveur du premier modèle. Dans le premier modèle, Bim est un tueur plus efficace que Bad car elle interagit directement avec Bax et Bak alors que dans le second modèle, Bim est plus efficace car elle peut interagir avec les 5 protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W, Mcl-1 et A1) (Lomonosova et Chinnadurai, 2009). Il semblerait alors qu'il faille les deux types d'action pour induire la mort de la cellule (Leber *et al*, 2007 ; Chipuk et Green, 2008).

Certaines protéines BH3-seulement, telles que tBid, ont la capacité de se lier à des phospholipides spécifiques de la mitochondrie tels que des cardiolipines et de former des pores dans des bicouches lipidiques synthétiques permettant ainsi de déstabiliser ainsi la membrane externe mitochondriale (Cristea et Degli Esposti, 2004 ; Schendel *et al*, 1999).

Récemment, il a été montré que le domaine BH3 de ces protéines pro-apoptotiques pouvait induire la mort cellulaire indépendamment de Bax et Bak, en induisant une fission mitochondriale (Shroff *et al*, 2009).

Ces protéines possèdent donc de multiples façons pour induire la mort cellulaire, d'où l'importance de leurs régulations dans les processus apoptotiques.

2.2.2- Les protéines pro-apoptotiques à multi domaines BH

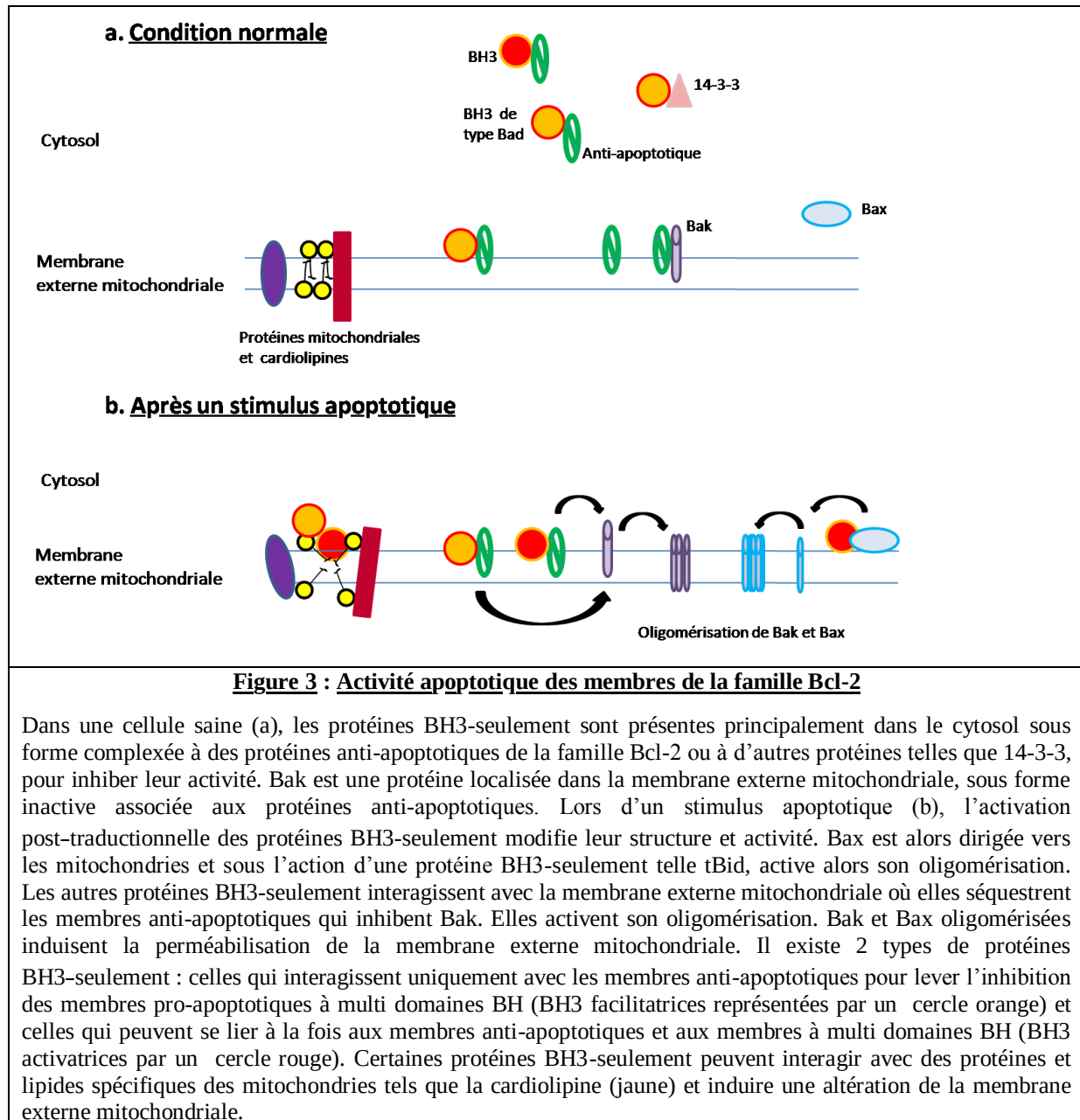
Bax et Bak sont responsables de la perméabilisation des membranes des organites intracellulaires, notamment la mitochondrie et le réticulum endoplasmique et induisent l'activation des caspases (Willis *et al*, 2005). Leur délétion inhibe le relargage de molécules apoptotiques, telles que le cytochrome c, de la mitochondrie vers le cytosol (Wei *et al*, 2000). Bak est localisée au niveau de la membrane externe mitochondriale, maintenue dans un état monomérique inactif *via* son interaction avec la protéine VDAC2 (Cheng *et al*, 2003). Bax est, quant à elle, maintenue inactive dans le cytosol des cellules saines, associée avec la protéine 14-3-3 (Tsuruta *et al*, 2004). Suite à un stress apoptotique, Bax est libérée de 14-3-3 et transloquée à la membrane externe mitochondriale (Park *et al*, 2008). Dans la membrane, l'activation de Bax et Bak modifie leur conformation, ce qui leur permet de s'oligomériser, de dépolariser la mitochondrie et de relarguer des molécules pro-apoptotiques (Lomonosova et Chinnadurai, 2009). Dans le réticulum endoplasmique, l'activation de Bak et Bax engendre le relargage de calcium qui peut dépolariser la membrane externe mitochondriale (Criddle, 2007). Bak et Bax sont activées directement ou indirectement par les protéines BH3-seulement. Certaines d'entre elles peuvent interagir avec Bax et Bak et induire directement leur activation, tandis que d'autres les activent de manière indirecte en séquestrant les protéines anti-apoptotiques (Willis *et al*, 2007). Bax et Bak induisent également la fragmentation mitochondriale, ce qui suggère des connections entre les membres de la famille Bcl-2 et le processus de fission mitochondriale (Sheridan *et al*, 2008).

2.2.3- Les protéines anti-apoptotiques

L'activation de Bax et Bak est inhibée par les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Bcl-2, Mcl-1, Bcl-X_L, Bcl-W et A1). Ces gardiennes de l'intégrité mitochondriale et du réticulum endoplasmique sont inactivées lorsque les protéines BH3-seulement s'insèrent, *via* leur domaine BH3 dans leur sillon hydrophobe (Adams, 2003). Le ratio entre les membres pro-apoptotiques activés et les membres anti-apoptotiques inactivés déciderait si le cytochrome c est relargué ou non des mitochondries et déterminerait alors la susceptibilité d'une cellule à un signal apoptotique (Kuwana *et al*, 2005).

Généralités – Etapes clés de la mort cellulaire programmée

Phase de décision : les protéines de la famille Bcl-2



2.3- Au-delà de la mort : L'implication des membres de la famille Bcl-2 dans des fonctions autres qu'apoptotiques.

Il est maintenant admis que les membres de la famille Bcl-2 ont des fonctions cellulaires autres que celles de la régulation de la mort cellulaire programmée. Bad régule le métabolisme du glucose dans la respiration mitochondriale, la sécrétion d'insuline et l'homéostasie du glucose (Danial *et al*, 2003, 2009). Bid est le substrat des kinases ATM/ATR dans le point de contrôle sur les dommages de l'ADN à l'entrée de la phase S du cycle cellulaire (Kamer *et al*, 2005 ; Zinkel *et al*, 2005). Dans des cellules saines, Bax et Bak influencent la dynamique des tubules mitochondriaux lors des phénomènes de fission/fusion, ce qui a une importance capitale dans l'oxydation mitochondriale et la synthèse de l'ATP

(Karbowski *et al*, 2006). Etant impliquées dans des processus capitaux pour la cellule, ces protéines de la famille Bcl-2 servent de points de contrôle critiques dans la mort cellulaire lorsque l'homéostasie cellulaire est violée.

Etant des éléments critiques de la mort cellulaire, ces membres sont extrêmement régulés, notamment par des modifications post-traductionnelles, qui feront l'objet d'une partie spécifique dans ces généralités (II.3 Régulation des protéines apoptotiques de la famille Bcl-2 par modifications post-traductionnelles).

3. Phase d'exécution

La phase d'exécution est la phase au cours de laquelle sont activées des enzymes qui dégradent des substrats cellulaires provoquant la mort de la cellule.

3.1- Les différentes voies impliquées dans l'apoptose

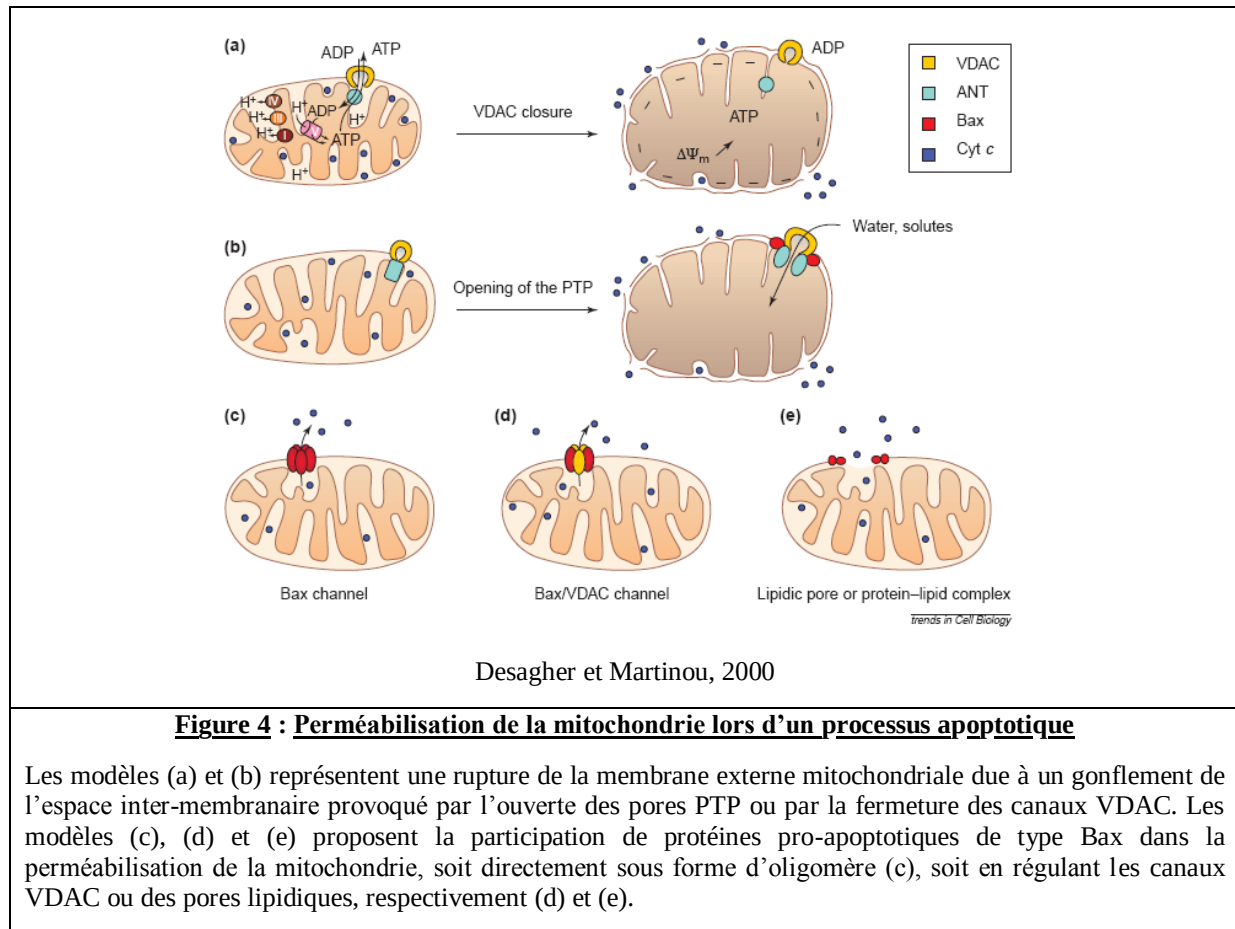
3.1.1- La voie intrinsèque mitochondriale

Les mitochondries sont à la fois une source de génération d'ATP pour la cellule mais également un élément régulateur du mécanisme d'apoptose. La perméabilisation de leur membrane externe conduit à la perte du potentiel transmembranaire mitochondrial et au relargage de molécules pro-apoptotiques (cytochrome c, Smac/Diablo, Omi/HtrA2, l'Endonucléase G ou encore AIF) de l'espace inter membranaire vers le cytosol (Wei *et al*, 2000). Le cytochrome c, Smac/Diablo et Omi/HtrA2 ont un effet sur les caspases alors que l'AIF et l'EndoG agissent dans une voie indépendante des caspases (Saelens *et al*, 2004). L'oligomérisation de Bax et Bak, permet la sortie de ces molécules dans le cytosol. Ces protéines fonctionnent comme une porte d'entrée de la voie intrinsèque mitochondriale. L'activation et l'oligomérisation de Bax et Bak dépendent de protéines de la famille de Bcl-2, les protéines à domaine BH3 (Kuwana *et al*, 2005 ; Chen *et al*, 2005). Bcl-2 et ses homologues Bcl-X_L et Mcl-1 peuvent séquestrer ces protéines à domaine BH3-seulement pour inhiber l'activation de Bax et Bak et ainsi bloquer la perméabilisation de la membrane externe des mitochondries (Cheng *et al*, 2001). La neutralisation de molécules anti-apoptotiques et une activation directe de Bak et Bax semblent toutes les deux nécessaires pour induire la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale suite à un stimulus apoptotique (Leber *et al*, 2007 ; Chipuk et Green, 2008).

Même si l'activation de Bax et Bak est clairement identifiée comme responsable de la sortie des molécules pro-apoptotiques, plusieurs théories émanent quant à ce relargage (Figure 4). La sortie de ces molécules pro-apoptotiques pourrait résulter de la formation de pores dans la membrane externe mitochondriale par oligomérisation de Bax, par association de Bax avec le canal VDAC (*Voltage-Dependant Anion Channel*), ou par des lipides associés ou non à des protéines. Bax et Bak pourraient également induire l'ouverture du mtPTP (*mitochondrial Permeability Transition pore*) et/ou la fermeture du VDAC et provoquer une rupture de la membrane externe mitochondriale ce qui permettrait la sortie de grosses molécules (Desagher et Martinou, 2000).

Généralités – Etapes clés de la mort cellulaire programmée

Phase d'exécution : différentes voies apoptotiques



Plus récemment, il a été montré, lors d'un processus apoptotique, que le canal VDAC est clivé par une calpaïne mitochondriale, provoquant l'accumulation de Bax au sein des mitochondries. L'interaction entre VDAC clivé et Bax forme alors un complexe permettant de libérer la forme tronquée de l'AIF dans le cytosol (Ozaki *et al*, 2009).

La protéine t-Bid peut s'oligomériser dans la membrane externe mitochondriale et induire l'apoptose *via* une fuite de cytochrome c (Grinberg *et al*, 2002).

Le cytochrome c interagit avec Apaf 1, protéine effectrice de caspase. Apaf 1 peut alors s'oligomériser. Chaque molécule Apaf 1 recrute une pro-caspase 9. L'ensemble forme l'apoptosome, qui active alors la caspase-9 (Hill *et al*, 2004). La caspase-9 va à son tour activer la caspase-3 qui va déclencher l'apoptose par l'activation d'une cascade de caspases qui vont cliver des substrats critiques pour la survie de la cellule. La caspase-3 peut également cliver directement ses propres substrats.

Smac/Diablo inhibe les inhibiteurs d'apoptose (IAP) qui bloquent l'activation de la caspase-9 ainsi que celle de la caspase-3 (Creagh *et al*, 2004).

L'AIF et l'Endonucléase G vont être libérées puis redirigées vers le noyau pour induire la fragmentation chromatinienne (Andrabi *et al*, 2008 ; Galluzi *et al*, 2008).

Omi/HtrA₂, libérée dans le cytosol, inactive les IAP (Galluzi *et al*, 2008). Contrairement à Smac/Diablo qui provoque une inactivation réversible des IAP, en bloquant leur fonction

ubiquitine ligase (Creagh *et al*, 2004), Omi/HtrA2 les inactive de manière irréversible (Verhagen *et al*, 2002).

3.1.2- La voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort

La voie extrinsèque est déclenchée suite à l'activation de récepteurs de mort par des ligands, qu'ils soient solubles ou bien présentés par d'autres cellules. Ces récepteurs de mort, dont TNF-R, Fas-R, TRAIL, font partie de la famille des récepteurs au TNF (*Tumor Necrosis Factor*), (Bhardwaj et Aggarwal, 2003). Ils ont la particularité de posséder un domaine de mort DD (Death Domain) dans leur région cytoplasmique, domaine qui leur permet de recruter des protéines qui vont déclencher des cascades de signalisations variées (Lavrik *et al*, 2005). Ces récepteurs peuvent être divisés en deux groupes selon la nature des molécules qui s'associent au domaine de mort (Figure 5).

Dans le 1^{er} groupe, la fixation du ligand Fas ou TRAIL sur son récepteur induit une oligomérisation du récepteur. FADD, une protéine effectrice de caspase va reconnaître le récepteur oligomérisé puis recruter la pro-caspase 8/10. Ce complexe protéique forme le DISC, *Death Inducing Signaling Complex* et active la caspase-8/10 qui active à son tour la caspase-3 ou d'autres caspases. Ces dernières vont cliver des substrats critiques pour la vie de la cellule et induire sa mort. FADD peut également recruter la protéine FLIP qui empêche le recrutement et donc l'activation de la pro-caspase-8/10 (Peter et Krammer, 2003).

Dans le 2^{ème} groupe, la fixation de TNF sur son récepteur TNF-R induit une oligomérisation du récepteur. L'activation de ce récepteur induit deux voies de signalisation différentes en fonction des molécules recrutées sur le domaine de mort cytoplasmique. Soit le complexe recrute les protéines RIP, TRADD et TRAF-1/2 et conduit à l'activation de JNK ou NF- κ B (*Nuclear Factor κ B*), ce qui mène la plupart du temps à la prolifération, soit il recrute les protéines TRADD, FADD, la pro-caspase-8/10 et TRAF-1/2 formant ainsi un complexe protéique nommé TRADDOSOME chargé d'activer la caspase-8, ce qui mène généralement à l'apoptose (Micheau et Tschopp, 2003).

De même, la sécrétion par les lymphocytes T cytotoxiques de perforine et son homodimérisation en canal permet au Granzyme B, également sécrétée par le lymphocyte, d'induire la mort cellulaire par activation directe de la caspase-3 ou par activation de Bid (Darmon *et al*, 1995 ; Barry *et al*, 2000).

Généralités – Etapes clés de la mort cellulaire programmée

Phase d'exécution : différentes voies apoptotiques

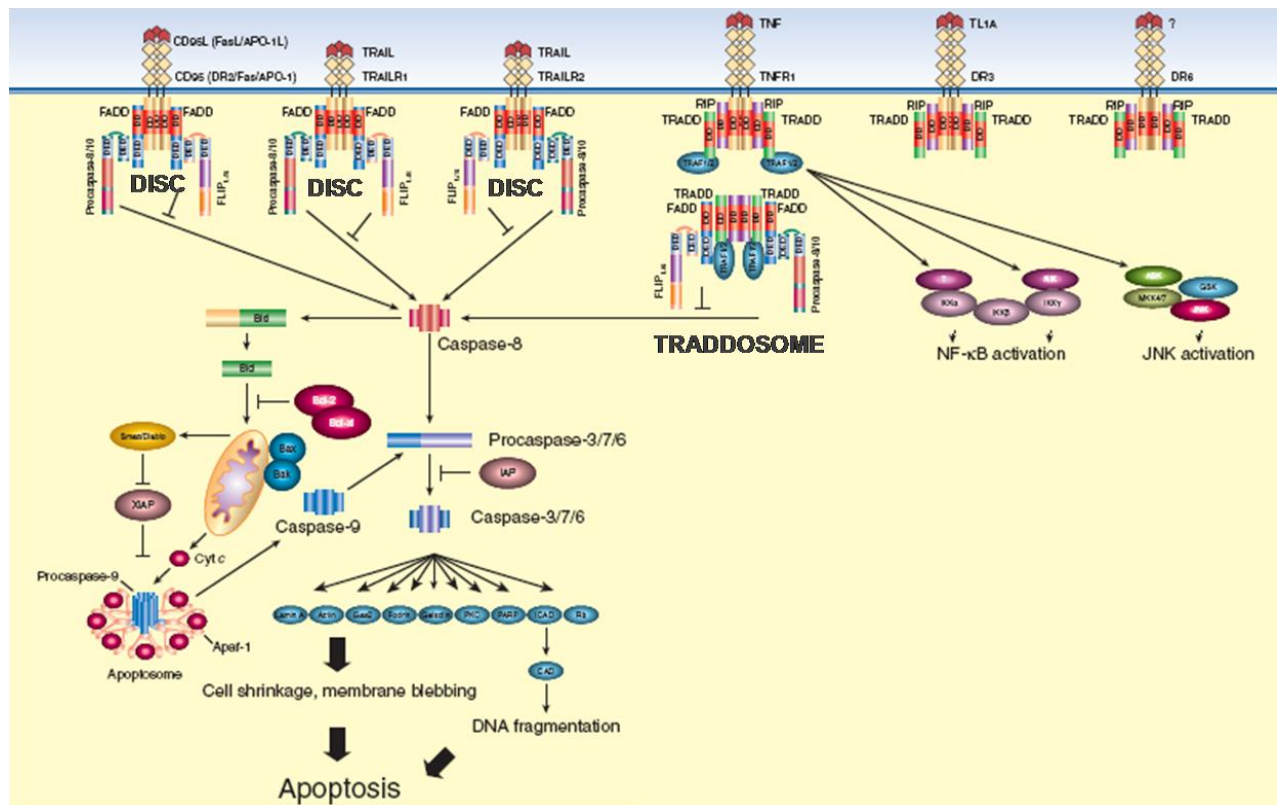


Figure 5 : Les différents types de récepteurs impliqués dans la signalisation de l'apoptose

Les récepteurs de mort peuvent être classés en 3 groupes en fonction de la nature du ligand (Fas, TRAIL et TNF) et de la nature des molécules intracellulaires recrutées sur le domaine de mort (DD) coté cytosolique du récepteur. Le recrutement de protéines FADD sur les récepteurs Fas et TRAIL conduit à la formation du DISC par recrutement de la pro-caspase 8/10 *via* le domaine effecteur de mort (DED). Sur le récepteur TNF, le recrutement de protéines TRADD puis FADD *via* le DD conduit à la formation du TRADDOSOME par recrutement de la pro-caspase 8/10 *via* le DED. Ces 2 voies conduisent à l'activation de la caspase-8 puis au phénomène apoptotique. La signalisation de ces récepteurs peut être inhibée par le recrutement de la protéine FLIP au niveau du DED de FADD. Dans le dernier cas, le simple recrutement de RIP et TRADD au niveau du récepteur au TNF conduit à une signalisation anti-apoptotique *via* la voie NF- κ B ou JNK.

3.1.3- Relation entre la voie extrinsèque des récepteurs et la voie intrinsèque mitochondriale

La voie intrinsèque et la voie extrinsèque peuvent coexister (Figure 6). La caspase-8 activée ou le Granzyme B peuvent induire la protéolyse de la protéine Bid (*BH3-interacting domain death agonist*) en tBid. La forme tronquée de Bid peut induire le relargage de cytochrome c en activant directement le complexe Bax/Bak ou de manière indépendante de Bax/Bak et des mtPTP (Kim *et al*, 2000). tBid forme un homotrimère dans la membrane externe mitochondriale et participe ainsi à l'induction de la mort cellulaire (Grinberg *et al*, 2002).

Dans certaines cellules, la voie extrinsèque des récepteurs n'est pas suffisante en elle-même pour déclencher l'apoptose, et la voie intrinsèque mitochondriale serait un phénomène d'amplification indispensable (Barnhart *et al*, 2003).

Généralités – Etapes clés de la mort cellulaire programmée

Phase d'exécution : différentes voies apoptotiques

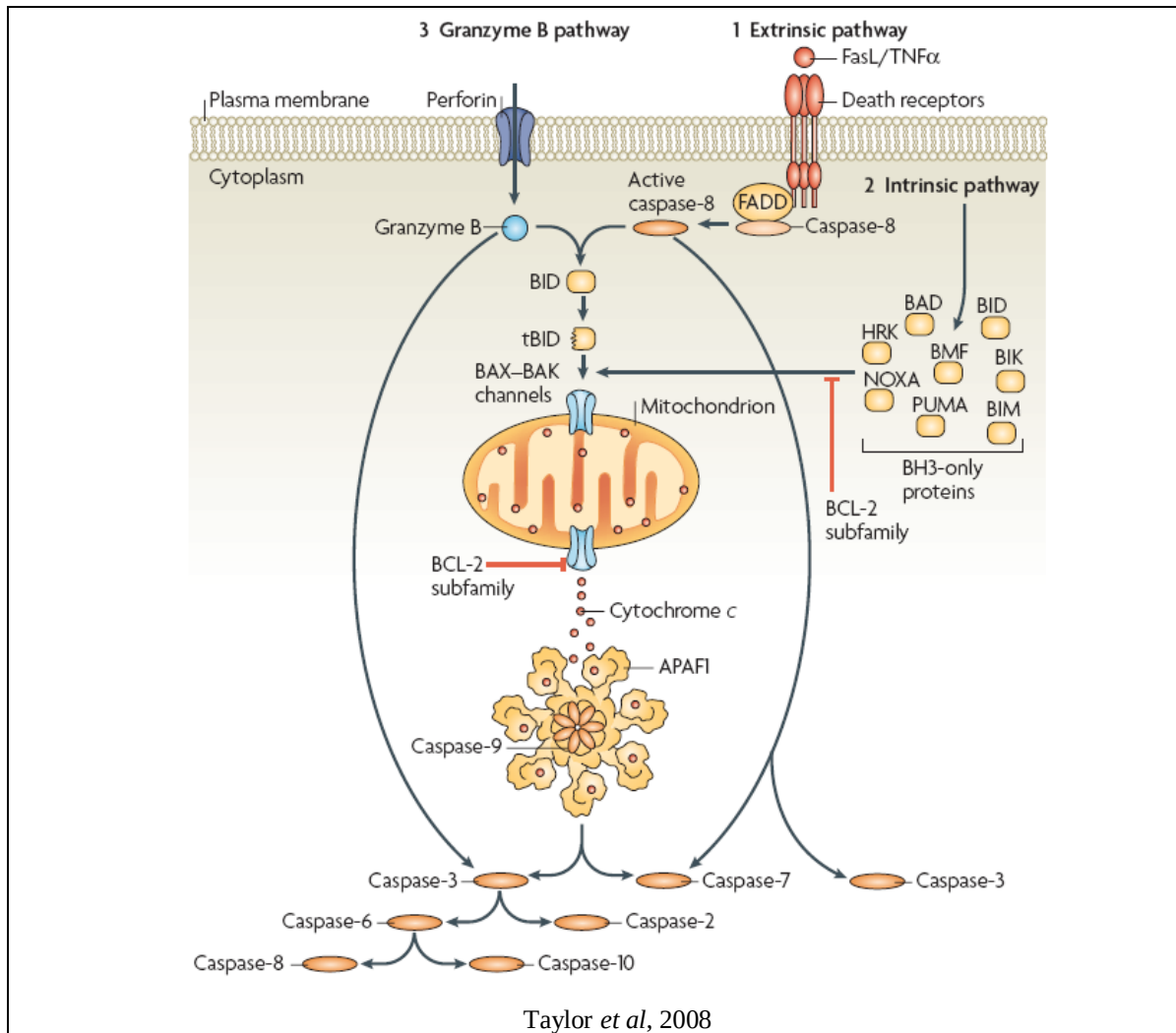


Figure 6 : Les voies d'exécution de la mort cellulaire programmée

La voie 1 nécessite la fixation de facteurs extracellulaires (FASL/TNF α) sur un récepteur de mort, qui permet le recrutement, coté cytosolique, de protéines adaptatrices telles que FADD permettant elle-même de recruter la caspase-8. La caspase-8 peut directement activer la caspase-3 et la caspase-7, responsables en partie, des changements morphologiques et biochimiques observés. La caspase-8 a également pour substrat Bid : elle clive Bid en tBid, protéine BH3-seulement qui déclenche la perméabilisation de la membrane mitochondriale. La voie extrinsèque peut donc stimuler la voie intrinsèque pour une réponse plus importante du phénomène apoptotique. La voie 2 correspond à la voie intrinsèque mitochondriale, déclenchée par l'activation de Bak/Bax et l'inhibition des membres anti-apoptotiques par les protéines BH3-seulement. Cette activation engendre une perméabilisation de la membrane externe mitochondriale et une fuite de molécules pro-apoptotiques de la mitochondrie vers le cytosol. Entre autre, le relargage de cytochrome c va permettre la formation de l'apoptosome ; complexe protéique composé de APAF-1, de cytochrome c et de la pro-caspase-9 ; à l'origine de l'activation de cascades de caspases, protéines effectrices de la mort cellulaire. La voie 3, voie du granzyme B, implique le relargage et l'entrée de cette molécule, via un canal de perforines, par des lymphocytes T cytotoxiques ou des cellules NK. Le granzyme B possède les mêmes propriétés que les caspases et peut donc activer Bid ou directement une cascade de caspases.

3.1.4- La voie intrinsèque du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) et dans une moindre mesure la mitochondrie constituent une réserve intracellulaire de calcium servant à réguler la concentration calcique $[Ca^{2+}]$ cytosolique nécessaire à l'activité cellulaire (Rizzuto *et al*, 1993). En effet, le calcium est impliqué dans de nombreux processus vitaux tels que la contraction musculaire, l'exocytose, la transmission synaptique (ouverture de canaux dépendants du voltage), la signalisation cellulaire, l'activité catalytique de nombreuses enzymes (Berridge, 1993). La $[Ca^{2+}]$ dans un compartiment cellulaire donné est contrôlée par une activité régulée des transporteurs de Ca^{2+} et des canaux Ca^{2+} situés au sein des membranes des compartiments. La $[Ca^{2+}]$ cytosolique, $[Ca^{2+}]_c$, d'une cellule au repos reste faible ($\approx 10^{-7}M$) comparé à sa $[Ca^{2+}]$ dans l'espace extracellulaire ou dans la lumière du RE ($[Ca^{2+}]_{RE}$) qui peut être 10 000 fois supérieure (Kriazhev, 2009). Les canaux calcium restent donc généralement fermés et servent essentiellement à extraire le calcium cytosolique en excès (Berridge, 2001 ; Rimessi *et al*, 2008). Lors d'une réaction cellulaire, la $[Ca^{2+}]_c$ peut augmenter de 10 à 100 fois pour une courte durée (Rimessi *et al*, 2008). Si l'élévation de la $[Ca^{2+}]_c$ est prolongée voir même augmentée, alors cela conduit à la mort de la cellule par apoptose ou nécrose (Criddle *et al*, 2007). C'est une des raisons pour laquelle Kriazhev propose de cibler les canaux calciques pour induire la mort des cellules tumorales (Kriazhev, 2009).

Certains membres de la famille Bcl-2, anti et pro-apoptotiques, sont également localisés dans le RE mais leur fonction reste peu connue (Figure 7). Ils pourraient influencer son homéostasie en régulant la perméabilité de sa membrane et le relargage du calcium du RE au cytosol. Bcl-2 possède également une fonction anti-apoptotique dans le RE (Rudner *et al*, 2001). Rizzuto et son équipe ont montré qu'une surexpression de Bcl-2 réduit la $[Ca^{2+}]_{RE}$ (Chami *et al*, 2004). Cette diminution de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ protège les cellules de l'apoptose tandis qu'une augmentation de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ sensibilise les cellules à l'apoptose (Lilliehook *et al*, 2002). En effet changer la $[Ca^{2+}]_{RE}$ augmente l'activité de IP3R, connue pour sensibiliser les mitochondries aux protéines BH3-seulement au cours de l'apoptose (Csordás *et al*, 2002).

Suite à un stimulus apoptotique, Bax et Bak peuvent s'insérer dans les membranes du RE, induire une fuite de calcium dans le cytosol et activer la caspase-12 (Zong *et al*, 2003). Cette caspase-12 induira la mort cellulaire via l'activation de la caspase-3 (Kerbiriou *et al*, 2009).

Parallèlement, dans les mitochondries, ils induisent la fuite de cytochrome c dans le cytosol. Le cytochrome c peut ensuite être redirigé dans le RE, interagir et activer les récepteurs à l'IP3 au niveau de la membrane provoquant ainsi l'augmentation de $[Ca^{2+}]_c$. Cette augmentation de $[Ca^{2+}]_c$ amplifie le phénomène apoptotique (Liao *et al*, 2008). Certaines protéines BH3-seulement interviennent également dans la voie apoptotique intrinsèque du RE. Bik est principalement localisée au RE (Mathai *et al*, 2005). Bik induit le relargage de cytochrome c et ce, indépendamment d'une association avec la mitochondrie (Germain *et al*, 2002). L'activité de Bik est influencée par Bcl-2 dans le RE. Bik forme un hétérodimère avec Bcl-2 au niveau de la membrane. Le ratio Bik/Bcl-2 dans la mitochondrie conditionne le phénomène apoptotique (Gillissen *et al*, 2003). Une surexpression de Bik augmente le relargage de calcium dans le cytosol et induit l'apoptose alors qu'une

Généralités – Etapes clés de la mort cellulaire programmée

Phase d'exécution : différentes voies apoptotiques

surexpression de Bcl-2 protège de l'apoptose induite par Bik (Mathai *et al*, 2005). D'autres protéines BH3-seulement (Bim, Noxa) sont également localisées au niveau du RE et ont peut-être une fonction similaire (Puthalakath *et al*, 2007 ; Oda *et al*, 2000). Sous l'effet d'un stress cellulaire, Bim est transloquée au RE. Elle active la caspase-12 à l'origine de l'activation d'une cascade de caspases spécifiques de RE, déclenchant ainsi la mort cellulaire (Morishima *et al*, 2004).

De plus, la présence élevée de calcium dans le cytoplasme peut activer certaines enzymes, telles que la calcineurine, phosphatase dépendante de calcium, qui provoque la déphosphorylation de Bad. Bad déphosphorylée est transloquée à la mitochondrie pour activer Bax et Bak (Wang *et al*, 1999).

Le calcium libéré dans le cytosol peut être recapturé par les mitochondries et provoquer une ouverture des pores mtPTP, une dépolarisation de la membrane externe mitochondriale et une libération des molécules apoptotiques de l'espace inter-mitochondrial (Criddle, 2007).

La voie intrinsèque du RE n'est pas une voie apoptotique à proprement parler mais elle permet d'amplifier ou de déclencher le processus de mort en stimulant les voies intrinsèque mitochondriale et extrinsèque.

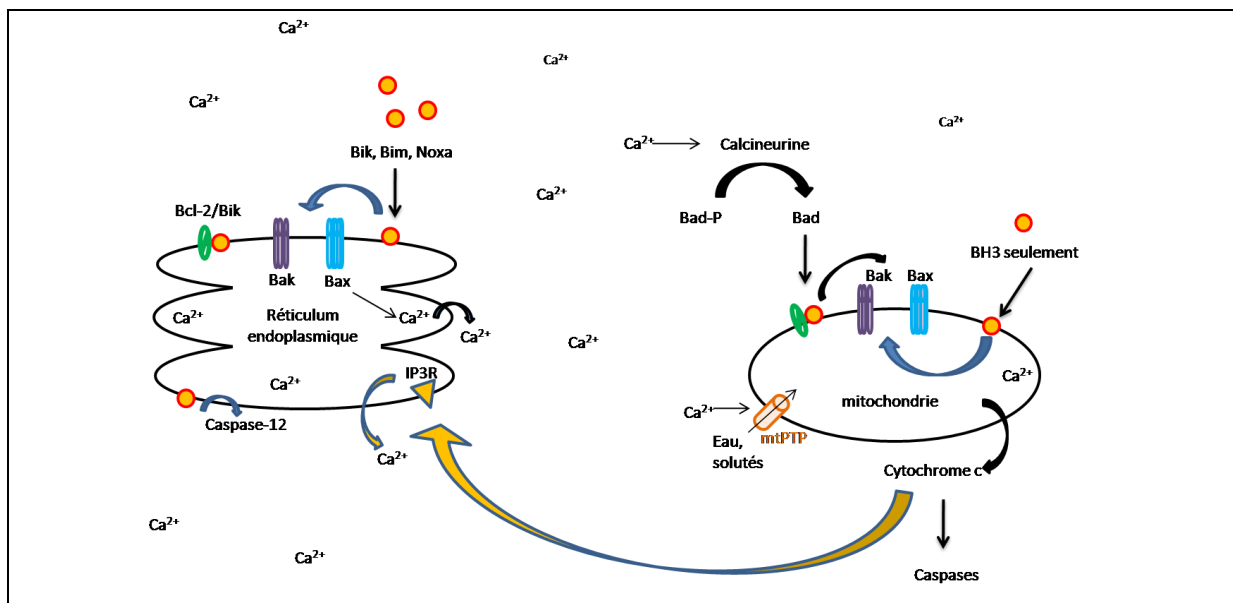


Figure 7 : Modèle de régulation de la mort cellulaire induite par les membres de la famille de Bcl-2 au niveau du RE et de la mitochondrie

Suite à un stress cellulaire, la concentration de protéines BH3-seulement augmente au niveau du RE. En excès par rapport aux protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, les protéines BH3-seulement mobilisent le calcium du RE pour sensibiliser les mitochondries ou induire des processus dépendants du calcium dans le cytosol. L'activation de Bak et Bax au RE par les protéines BH3-seulement induit une fuite du calcium dans le cytosol. Ce calcium peut activer la calcineurine, une phosphatase qui provoque la déphosphorylation de Bad. Bad activée est transloquée à la mitochondrie pour induire la perméabilisation de la membrane externe et induire le relargage de cytochrome c. Pour amplifier le signal apoptotique, le cytochrome c peut stimuler les récepteurs à l'IP3 sur la membrane du RE qui induisent le relargage de calcium dans le cytosol. L'augmentation du calcium cytoplasmique peut également induire l'ouverture des mtPTP et ainsi dépolariser la membrane externe.

3.1.5- La voie indépendante des caspases

L'apoptose est l'un des principaux types de mort cellulaire programmée et implique des caractéristiques morphologiques et biochimiques typiques (voir la partie suivante : 3.2). Parmi ces caractéristiques, on note le relargage de l'AIF (Apoptosis-Inducing Factor) (Figure 8) et de l'Endonucléase G des mitochondries (Ye *et al*, 2002).

Le gène de l'AIF est un gène nucléaire qui est transcrit puis traduit sous une forme de précurseur protéique contenant à son extrémité N-terminale, un signal de localisation mitochondriale (MLS) (Loeffler *et al*, 2001). Suite à l'import de l'AIF à la mitochondrie, le MLS est clivé. Ce clivage démasquerait un domaine transmembranaire permettant à l'AIF de se fixer à la membrane interne mitochondriale où elle exercerait sa fonction oxydoréductase (Susin *et al*, 1999; Otera *et al*, 2005; Miramar *et al*, 2001).

Suite à un stimulus apoptotique et à la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale, l'AIF serait clivée par une protéase à cystéine, de type calpaïne ou cathepsine, au niveau de son domaine transmembranaire, libérant ainsi une molécule soluble dans le cytoplasme (Otera *et al*, 2005, Polster *et al*, 2005). L'AIF est ensuite transloquée au noyau *via* un signal de localisation nucléaire (NLS) bipartite où elle exerce alors sa fonction apoptogène (Gurbuxani *et al*, 2003). Elle provoque une condensation chromatinienne accompagnée d'une digestion de l'ADN en fragments de haut poids moléculaire de 50 Kb, aidée par l'Endo G (Susin *et al*, 1999 ; Li *et al*, 2001). L'AIF est capable à elle seule d'induire l'apoptose nucléaire. Elle est indépendante des caspases (Susin *et al*, 2000).

L'AIF entraîne également une chute du potentiel membranaire mitochondrial provoquant une libération de protéines apoptogènes telles que le cytochrome c, une activation de la caspase-9 et l'externalisation des phosphatidylsérines à la surface de la membrane plasmique. L'AIF semble jouer un rôle important dans les premières phases de l'apoptose. Le relargage de cytochrome c active une cascade de caspases qui vont agir dans un processus classique d'apoptose. Malgré la présence de caspases dans les phases tardives du processus apoptotique, les événements induits par l'AIF demeurent indépendants des caspases. En effet, ils ont lieu en aval de son activation et une inhibition des caspases ou de protéines activant les caspases ne bloque pas ces événements (Krajewski *et al*, 1999 ; Scovassi *et al*, 2009 ; Joza *et al*, 2009).

Généralités – Etapes clés de la mort cellulaire programmée

Phase d'exécution : différentes voies apoptotiques

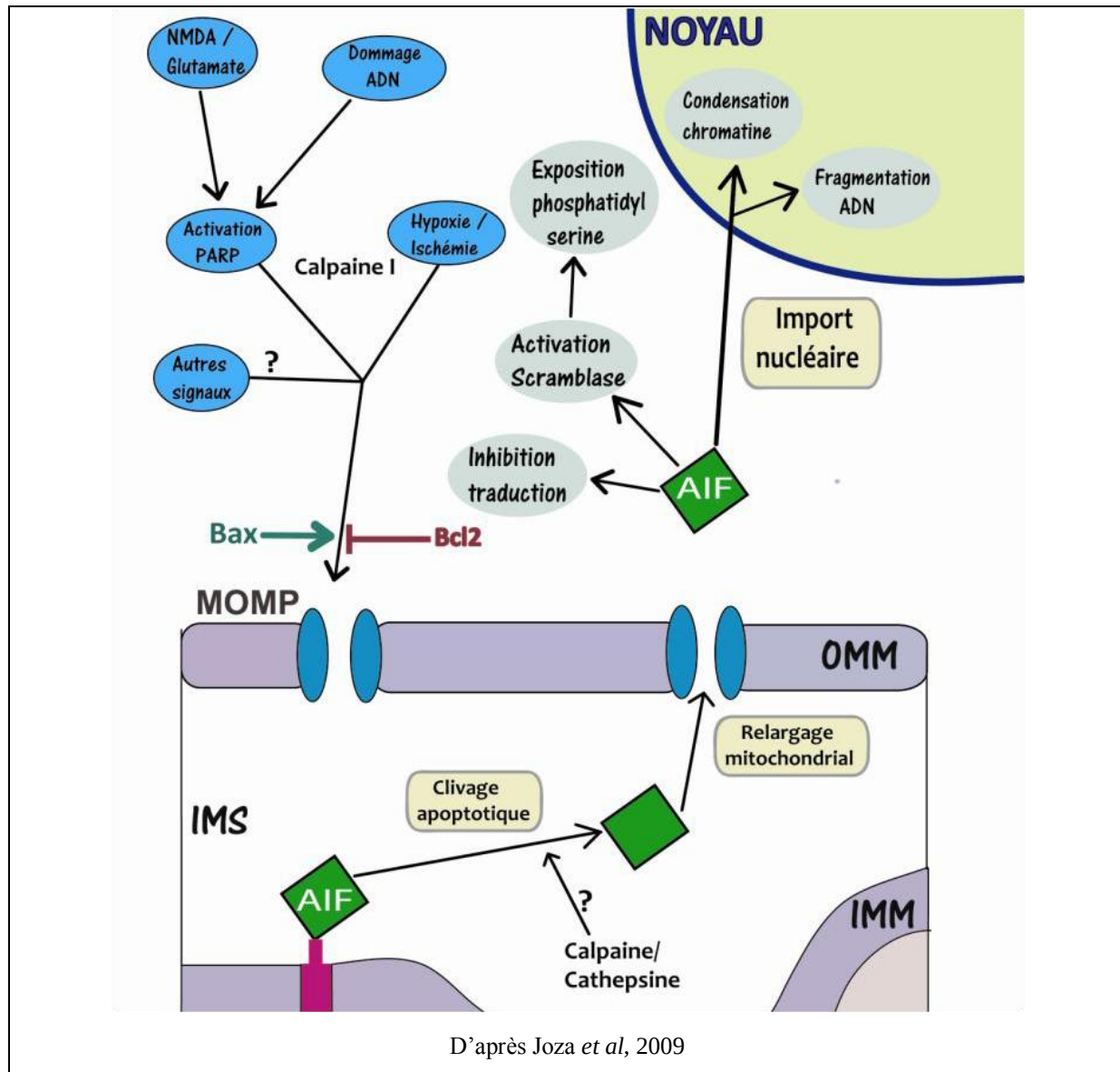


Figure 8 : L'AIF : De sa fonction oxydoréductase à sa fonction apoptotique

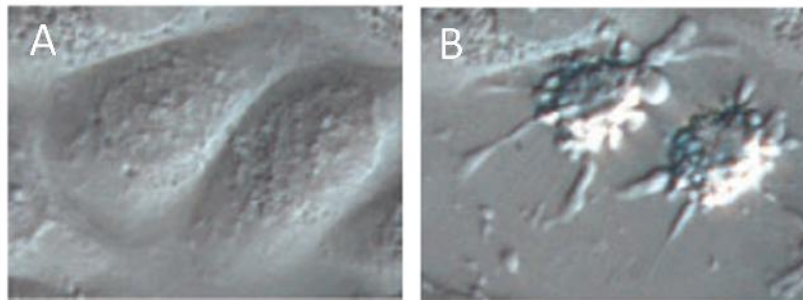
L'AIF, dans une cellule normale, est localisée au niveau de la membrane interne mitochondriale (IMM) pour y exercer une fonction oxydoréductase. Suite à un stimulus apoptotique et à la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale, (OMM), l'AIF est clivée par une protéase de type calpaïne ou cathepsine. La protéine apoptotique libérée est relarguée des mitochondries pour induire la mort cellulaire au niveau du noyau (fragmentation de l'ADN et condensation de la chromatine) mais également au niveau du cytoplasme où elle active la scramblase chargée de transloquer les phosphatidylsérines sur la face extracellulaire de la membrane plasmique et où elle inhibe la synthèse protéique.

AIF constitue ainsi le prototype des voies indépendantes des caspases. L'une de ces voies est la Parthanatos, une mort cellulaire induite par la poly (ADP-ribose) polymérase-1 (PARP-1), une protéine nucléaire qui facilite l'excision des bases de l'ADN dans le processus de réparation. Cette mort cellulaire possède ses propres caractéristiques biochimiques, à savoir une activation rapide de PARP-1, une accumulation de PAR (poly (ADP-ribose)), une dépolarisation de la mitochondrie, une translocation nucléaire de l'AIF, la perte de NAD et ATP cellulaires, et une activation des caspases à un stade tardif du processus. D'un point de vue morphologique, le noyau est condensé et la membrane bourgeonne (Wang *et al*, 2009a).

L'activation de PARP-1, suite à une ischémie, un désordre neuro-dégénératif, ou un traumatisme crânien, induit la formation de PAR, inducteur de la mort cellulaire et de nicotinamide, inhibiteur de PARP-1, selon un processus dépendant de NAD⁺ et de l'ATP. PAR est ensuite dirigée vers le cytosol où elle interagit avec la mitochondrie et provoque le relargage de l'AIF. AIF est transloquée vers le noyau et induit la fragmentation de l'ADN (Andrabi *et al*, 2008).

3.2- Modifications morphologiques et biochimiques du processus apoptotique

L'apoptose est caractérisée par une série de perturbations de l'architecture cellulaire, liée à des modifications biochimiques, qui contribue non seulement à la mort de la cellule mais également à préparer son élimination par les phagocytes.



Taylor *et al*, 2008

Figure 9 : Morphologie des cellules Hela en condition physiologique (A) ou soumises à un stimulus apoptotique (B)

Les cellules apoptotiques présentent une morphologie caractéristique, à savoir une diminution du volume cellulaire, un bourgeonnement de la membrane plasmique et une perte de contact avec les cellules voisines.

C'est dans la phase d'exécution que la cellule voit sa morphologie modifiée. La cellule s'arrondit, se rétracte, perd ses contacts avec les cellules voisines. La membrane plasmique bourgeonne puis la cellule se fragmente en corps apoptotiques qui vont être reconnus spécifiquement par des phagocytes (Figure 9). Parallèlement à ces modifications externes, la cellule subit des altérations de son architecture interne. La cellule se condense et fragmente ses organites intracellulaires (noyau, mitochondries, l'appareil de Golgi, réticulum endoplasmique) (Weedon *et al*, 1979). La plupart de ces événements est orchestrée par des membres de la famille des caspases (Nicholson et Thornberry, 1997). Ces protéases, et principalement les caspase-3 et 8, ciblent plusieurs centaines de protéines de façon contrôlée pour augmenter l'efficacité de reconnaissance par les phagocytes et minimiser l'activation du système immunitaire (Zhang *et al*, 2003 ; Mitchell *et al*, 2006). Ceci dit, dans des cellules issues du cancer du sein, défectueuses en caspase-3, suite à l'induction de la mort par traitement à l'ectoposide, un agent chimiothérapeutique, on constate toujours une phagocytose non inflammatoire des cellules (Turner *et al*, 2003). Les modifications morphologiques pour

qu'une cellule soit éliminée selon un processus non inflammatoire peuvent donc être régulées indépendamment des caractéristiques propres de l'apoptose qui requièrent la caspase-3.

3.2.1- Les causes de modifications morphologiques externes

❖ Caspases et cytosquelette

Le cytosquelette est un ensemble de polymères protéiques organisés qui confère à la cellule ses propriétés mécaniques. Il gouverne ainsi les mouvements internes (déplacement des chromosomes par exemple) et les déformations de la membrane plasmique (production de protubérances, d'invaginations, de sites d'adhésions...). Ces polymères sont classés en trois catégories : les filaments d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules. La protéolyse de ces constituants cellulaires par les caspases contribue aux modifications morphologiques observées lors du processus apoptotique (Figure 10) (Taylor *et al*, 2008).

❖ Caspases et molécules d'adhésion cellulaire

Les cellules adhèrent entre elles et avec la matrice extracellulaire qui les entoure pour maintenir l'intégrité du tissu. Ces contacts cellulaires sont établis *via* des protéines spécifiques et selon le type de protéines, la jonction est différente. Certaines de ces protéines sont des substrats des caspases, notamment les caténines (Brancolini *et al*, 1997), les cadhérines (Steinhausen *et al*, 2001), les protéines du desmosome (Dusek *et al*, 2006). La protéolyse de ces protéines entraîne la perte de contact, avec la matrice extracellulaire et avec les cellules avoisinantes, observée dans les premières étapes de l'apoptose (Figure 10) (Taylor *et al*, 2008).

Généralités – Etapes clés de la mort cellulaire programmée

Phase d'exécution : Modifications morphologiques et biochimiques

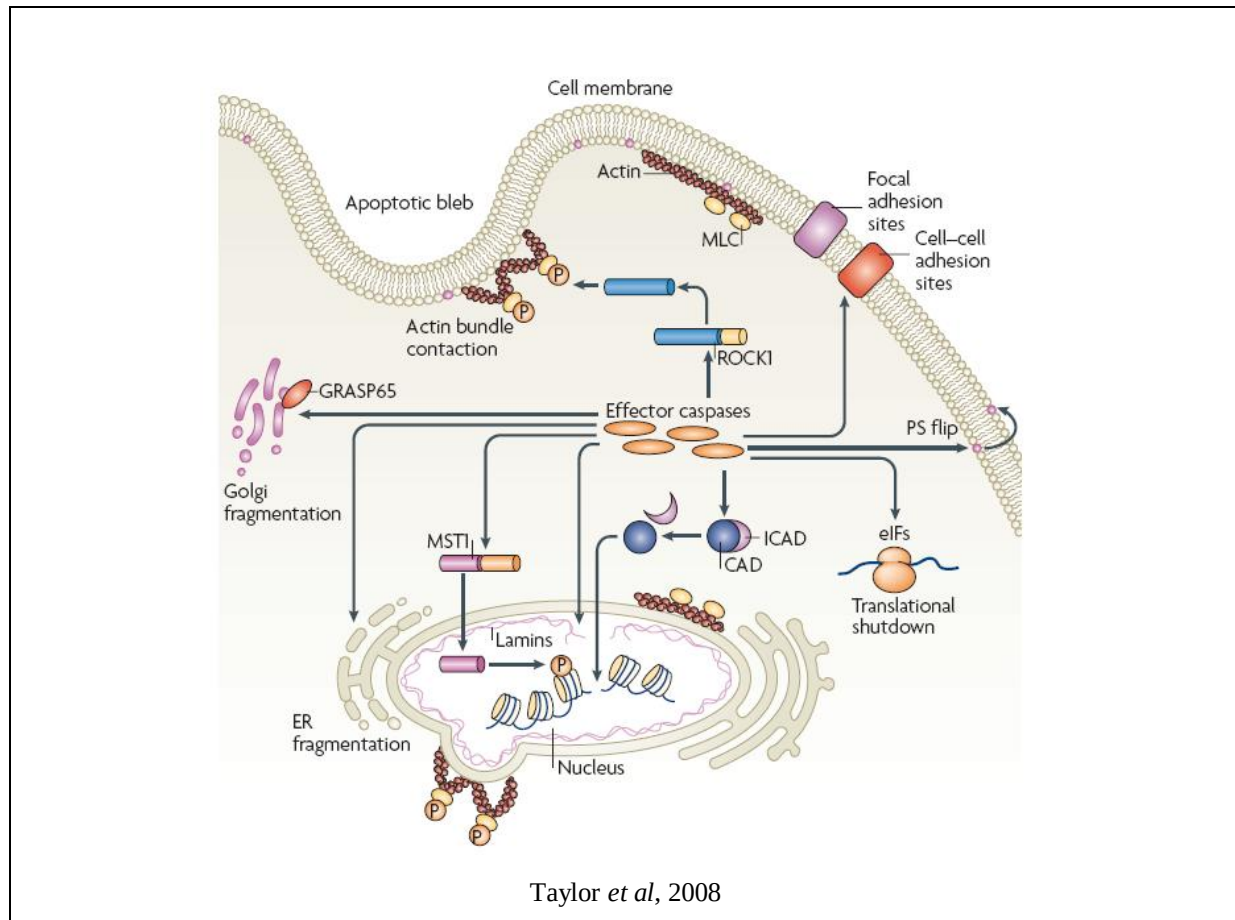


Figure 10 : Substrats des caspases impliqués dans les changements morphologiques d'une cellule apoptotique

Les caspases effectrices induisent la fragmentation de la plupart des organites intracellulaires (noyau, RE et Golgi) ainsi que le bourgeonnement de la membrane plasmique et l'externalisation de la phosphatidylsérine. La protéolyse de protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire permet à la cellule de perdre contact avec les cellules voisines.

La protéolyse de ROCK1 active sa fonction kinase, qui phosphoryle alors les chaînes légères de myosine (MLC) et provoque la contraction des filaments d'actine au niveau de la membrane plasmique et du noyau. Cette contraction est responsable du bourgeonnement des membranes. Une autre kinase est activée par protéolyse : la MST1. Elle induit la phosphorylation de l'histone H2B et la condensation de la chromatine. Dans le noyau, l'action des caspases sur les lamines désassemble les lamines nucléaires, facilitant la fragmentation du noyau. Au niveau du Golgi, le clivage de GRASP65 engendre sa fragmentation. Dans le cytosol, les caspases clivent ICAD, inhibiteur de la DNase CAD. CAD va alors être transloquée au noyau pour cliver l'ADN. Les caspases inhibent également des facteurs de traduction (eIFs).

3.2.2- Les causes de modifications morphologiques internes

❖ Modification nucléaire

Un des premiers éléments biochimiques caractéristiques de l'apoptose est la fragmentation de l'ADN en « échelle » (Williams *et al*, 1974). Ce phénomène est médié par des caspases qui clivent des inhibiteurs de nucléases (ICAD). Ces endonucléases CAD (Caspase activated DNase) clivent la chromatine au niveau de sites internucléosomiques (Sakahira *et al*, 1998).

Généralités – Etapes clés de la mort cellulaire programmée

Phase d'exécution : Modifications morphologiques et biochimiques

Chez les eucaryotes, l'ADN s'enroule autour de complexes protéiques appelés nucléosomes. Ces nucléosomes sont des octamères d'histones et sont responsables du degré de compaction de l'ADN. Le degré de compaction supérieur nécessite une phosphorylation des histones. Entre autre, MST1 (Mammalian Sterile-20) est une kinase qui phosphoryle l'histone H2B. Au cours de l'apoptose, MST1 est clivée et activée par la caspase-3 (Cheung *et al*, 2003 ; Ura *et al*, 2001). (Figure 10 ; Taylor *et al*, 2008).

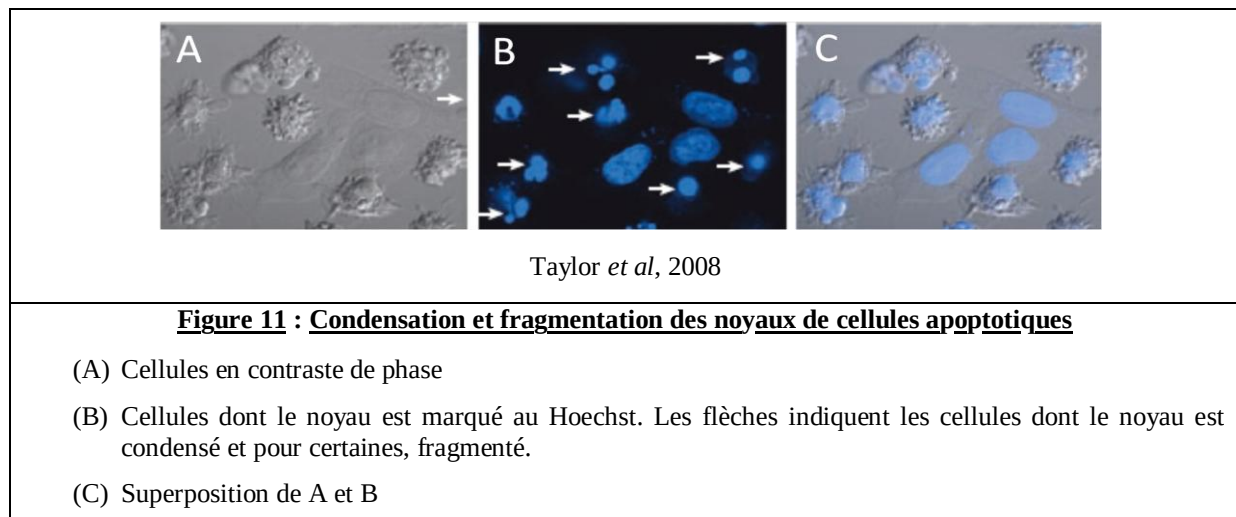
Cependant la fragmentation de l'ADN, comme d'autres événements de la phase d'exécution, ne semblent pas essentiels à la mort cellulaire (Schulze-Osthoff *et al*, 1994). Chez *Caenorhabditis elegans*, la dégradation de l'ADN a lieu dans le phagocyte (Wu *et al*, 2000). Cette fragmentation empêche une éventuelle division cellulaire et faciliterait la dégradation cellulaire par les phagocytes.

❖ Arrêt de l'expression génique

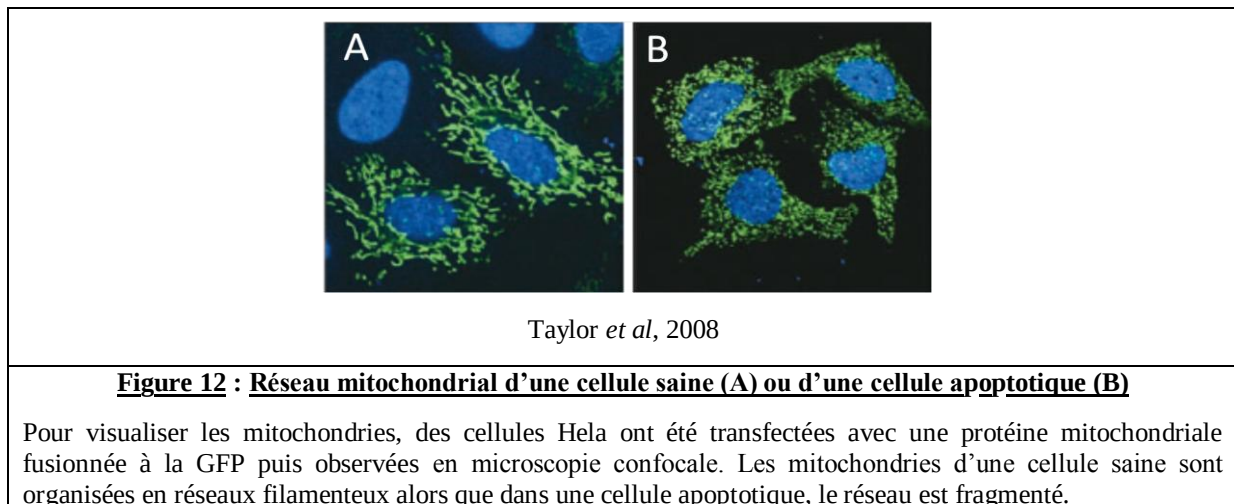
Les caspases ont également pour substrat des facteurs de transcription et des protéines ribosomales pour stopper l'expression des gènes (Lüthi et Martin, 2007).

❖ Fragmentation des organites intracellulaires

Une autre caractéristique de l'apoptose est la fragmentation des organelles. Les caspases sont une fois de plus la cause de la fragmentation du noyau, de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique (Figure 11) (Taylor *et al*, 2008).



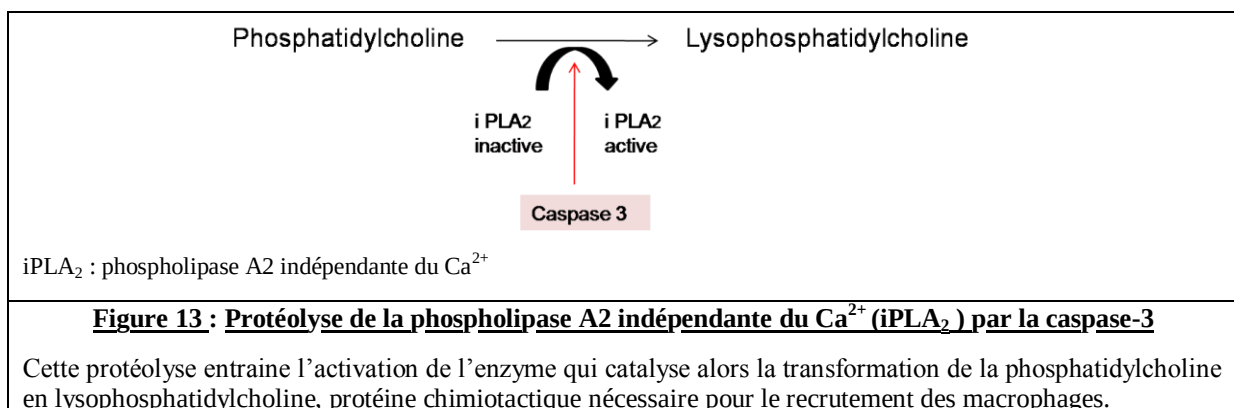
En revanche, les principaux effecteurs de la fragmentation mitochondriale ne sont pas les caspases mais des membres de la famille Bcl-2. Bax et/ou Bak sont activées très tôt au cours de l'apoptose par les protéines à domaine BH3-seulement. L'activation de ces protéines provoque la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale et le relargage de protéines inter-membranaires (Kuwana *et al*, 2005) puis la mitochondrie se fragmente (Figure 12) (Karbowski *et al*, 2002).



4- Phase d'élimination

Les corps apoptotiques sont reconnus spécifiquement par des phagocytes, cellules chargées de les éliminer en prévention d'une éventuelle réaction inflammatoire.

La cellule apoptotique relargue des molécules chimiotactiques, telles que la lysophosphatidylcholine sous l'action de la caspase-3 (Figure 13), pour attirer le phagocyte (Zhao *et al*, 2006).



Le phagocyte doit ensuite reconnaître les corps apoptotiques. La phosphatidylsérine est un phospholipide de la face interne de la membrane plasmique qui, suite à un stimulus apoptotique, est transloquée vers la face externe de la membrane plasmique. Les récepteurs

scavengers CD36, situés sur le phagocyte reconnaissent les phosphatidylsérines oxydées de la cellule apoptotique et induisent sa phagocytose (Greenberg *et al*, 2006). Cette translocation est également dépendante des caspases (Turner *et al*, 2003).

Ces molécules font partie d'une liste non exhaustive de molécules intervenant dans la clairance apoptotique. De plus, toutes les cellules apoptotiques ne forment pas de corps apoptotiques. C'est le cas des neutrophiles (Ren *et al*, 2001). Ce processus pourrait faciliter la digestion, par le phagocyte, des cellules les plus grosses.

II- Régulation du phénomène apoptotique

Le contrôle de l'activité des protéines apoptotiques peut se faire à plusieurs niveaux. De l'ADN à la protéine fonctionnelle, se succède une multitude d'étapes, chacune d'entre elles étant régulée de manière spécifique (Figure 14). Au cours de ma thèse, je me suis intéressée aux modifications post-traductionnelles de la mitogaligine, c'est pourquoi je développerai ce type de régulation.

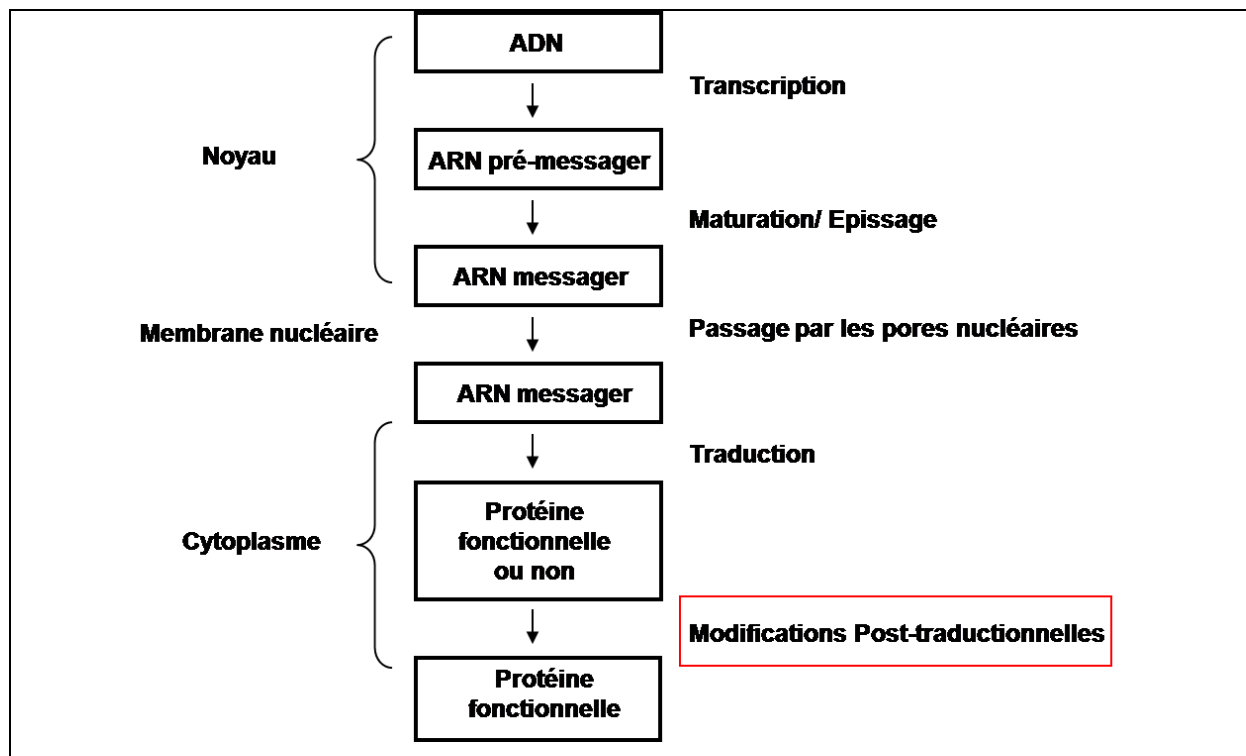


Figure 14 : Les différents niveaux de régulations de l'expression génique

La régulation de l'expression d'un gène peut avoir lieu aux niveaux transcriptionnel, post-transcriptionnel, du passage noyau/cytoplasme de l'ARN, traductionnel et post-traductionnel.

1- Régulation de l'activité apoptotique par modifications post-traductionnelles

La réponse apoptotique résulte de l'intégration de multiples voies de signalisations différentes et complexes communiquant entre elles. Elle doit donc être extrêmement contrôlée. Beaucoup de protéines cytotoxiques impliquées dans la mort cellulaire programmée sont exprimées constitutivement dans la cellule sous des conditions qui permettent à la cellule de vivre (Van Delft *et al*, 2006).

Leur activité, qui dépend à la fois de leur localisation cellulaire, de leur stabilité et de leur interaction avec d'autres protéines, est souvent régulée par des modifications post-traductionnelles (Hübner *et al*, 2008 ; Reinders et Sickmann, 2007).

Il existe plus d'une centaine de modifications post-traductionnelles et nous verrons dans cette partie, celles qui sont les plus fréquentes et représentatives de la régulation des molécules apoptotiques.

1.1- Par addition d'un groupe fonctionnel

1.1.1- La phosphorylation

Au cours d'une réponse apoptotique, les cycles de phosphorylation/déphosphorylation des protéines sont l'un des systèmes les plus importants dans la régulation de leurs activités. Plusieurs pathologies humaines sont associées à une phosphorylation anormale de protéines cellulaires, ce qui a valu le prix Nobel de médecine à Fisher et Krebs en 1992 pour leurs travaux sur les mécanismes de phosphorylation réversible des protéines.

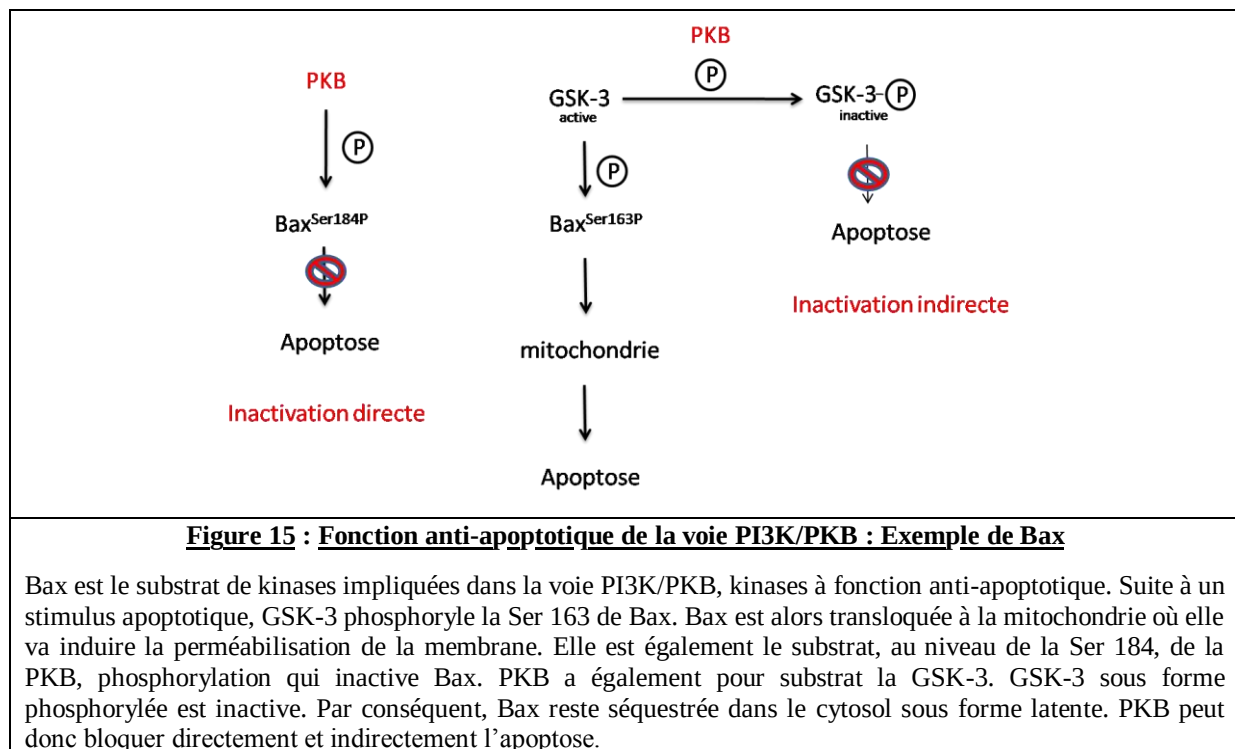
Ces cycles sont assurés par des kinases et phosphatases, qui sont régulées par des signaux extérieurs, comme les hormones, cytokines et autres facteurs de croissance ainsi que par les variations de calcium intracellulaire (Zhou *et al*, 2002). Ces enzymes sont inscrites dans des voies de signalisations complexes faisant intervenir des cascades de kinases. Dans la mort cellulaire programmée, l'une des voies les plus importantes est la voie PI3K/PKB, voie de la Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase/ Protéine Kinase B.

La voie PI3K/PKB affecte une gamme importante d'événements intracellulaires qui influencent directement ou indirectement la survie ou la mort d'une cellule. L'activation de PI3K, et de PKB en aval, joue un rôle critique dans la survie cellulaire en bloquant le phénomène apoptotique (Yao et Cooper, 1995). PKB peut inactiver des protéines pro-apoptotiques telles que Bad (Ser 136) (Blume-Jensen *et al*, 1998), Bax (Ser 154) (Gardai *et al*, 2004) ou avoir un effet positif sur de multiples molécules de survie telles que des facteurs de transcription (NFκB), des protéines inhibitrices de caspase (FLIP), des protéines anti-apoptotiques (Mcl-1).

Sous l'influence d'IL-3, PKB phosphoryle Bad sur la Ser 136, ce qui inhibe son activité pro-apoptotique par association avec la protéine 14-3-3 dans le cytosol (Ajjappala *et al*, 2009).

PKB phosphoryle Bax sur la Ser 184, ce qui inhibe son activité (Gardai *et al*, 2004). Bax est une protéine pro-apoptotique cytosolique qui nécessite d'être phosphorylée par GSK-3 sur la

Ser 163 pour être adressée à la mitochondrie. PKB peut phosphoryler GSK-3, rendant la kinase inactive (Van Weeren *et al*, 1998 ; Linseman *et al*, 2004). PKB peut donc agir directement ou indirectement pour supprimer l'activité de Bax (Figure 15). Il y a plusieurs autres voies possibles dans lesquelles GSK-3 contribue à la mort cellulaire par inhibition de la PKB (Pap et Cooper, (1998) : par régulation de la voie JNK (Mishra *et al*, 2007) ou par phosphorylation de la protéine anti-apoptotique Mcl-1, phosphorylation qui entraîne sa dégradation *via* le protéasome (Maurer *et al*, 2006).



D'autres protéines de la famille de Bcl-2 sont également régulées par PI3K/PKB. C'est le cas des protéines BH3-seulement Bim et Puma et de la protéine anti-apoptotique Bcl-X_L. Une partie de la régulation de l'apoptose passe par des facteurs de transcription, qui constituent une cible pour PKB. PKB, en phosphorylant ces facteurs conduit à leur séquestration dans le cytosol puis à leur dégradation (Brunet *et al*, 1999 ; Arden et Biggs, 2002). PKB phosphoryle IKK, l'inhibiteur du facteur de transcription NF-κB. La phosphorylation d'IKK entraîne sa dégradation *via* le système ubiquitine-protéasome. NF-κB est alors transloqué au noyau où il va induire la transcription de molécules de survie dont Bcl-X_L. Dans une cellule privée de cytokine, la voie PI3K/PKB est inactivée et le facteur de transcription FoxO3a peut alors augmenter la transcription de Bim et Puma pour induire l'apoptose (Dijkers *et al*, 2000 ; You *et al*, 2006).

Un autre moyen pour PI3K/PKB de bloquer l'apoptose est d'inhiber p53 en maintenant son inhibiteur mdm2 actif. La forme phosphorylée au niveau des Ser 166 et Ser186 de mdm2 provoque sa translocation au noyau et induit l'ubiquitylation et la dégradation de p53 (Mayo et Donner, 2001).

Il existe beaucoup d'autres protéines dont la régulation est critique pour la survie cellulaire et pour lesquelles la traduction peut être régulée par la voie PI3K/PKB. Prenons pour exemple l'importance de la traduction des protéines dans l'apoptose induite par TRAIL. Les protéines de survie cellulaire telles que Mcl-1, FLIP, XIAP ont une durée de vie courte alors que les membres pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2 et les caspases ont une durée de vie plus longue. Ainsi, la balance entre les molécules pro et anti-apoptotiques peut être perturbée en faveur de l'apoptose s'il y a une inhibition de la traduction des protéines de survie (White-Gilbertson *et al*, 2008). La voie PI3K/PKB est impliquée dans la régulation de la synthèse des protéines en phosphorylant 4E-BP1, l'inhibiteur de eIF-4E, facteur d'initiation de la traduction (Gingras *et al*, 1998). PI3K contribue ainsi à augmenter la traduction de Mcl-1 (Schubert et Duronio, 2001).

La phosphorylation est une modification post-traductionnelle capitale en ce qui concerne la signalisation cellulaire. Elle régule beaucoup de modifications post-traductionnelles (protéolyse, sumoylation, ubiquitinylation...). Nous verrons dans les modifications post-traductionnelles suivantes et dans la régulation des protéines de la famille Bcl-2 par modifications post-traductionnelles (Partie II.3), comment la phosphorylation peut réguler les autres transformations chimiques des protéines.

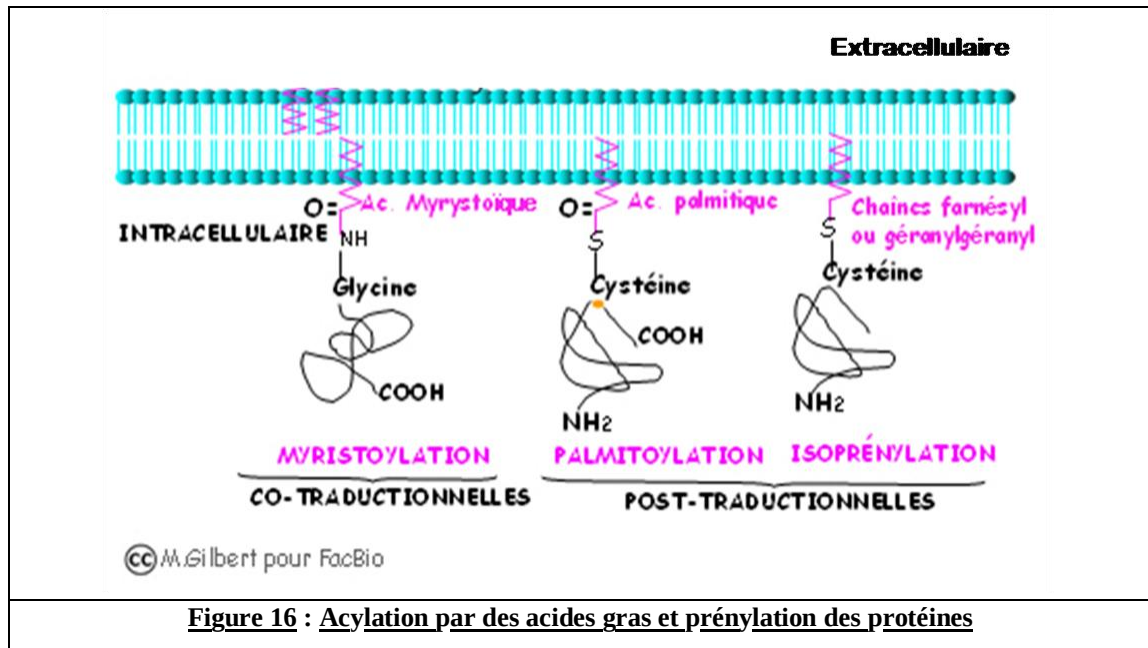
1.1.2- Modifications des protéines par les lipides

L'acylation et la prénylation correspondent à l'addition d'un groupement lipidique sur une protéine. Selon la nature de la chaîne lipidique, on parle de myristoylation, palmitoylation et d'isoprénylation (Resh, 1996) (Figure 16).

La myristoylation est l'addition de myristate (acide gras saturé en C14) sur une glycine de l'extrémité N terminale par une liaison amide. Les protéines N-myristoylées ont comme séquence initiale une méthionine suivie d'une glycine. Pendant la traduction, la méthionine initiateur est clivée, laissant la glycine libre pour une N-myristoylation éventuelle (Gordon *et al*, 1991). Ce phénomène est généralement co-traductionnel mais il a été montré que cette modification peut intervenir après la synthèse d'une protéine, lors d'un processus apoptotique. Cette modification prend le nom de « Myristoylation morbide » (Zha *et al*, 2000 ; Mishkind, 2001).

La palmitoylation est l'addition d'acide palmitique (acide gras saturé en C16) sur une cystéine de l'extrémité C-terminale par une liaison thioester. Certaines protéines ont été identifiées comme étant palmitoylées à leur extrémité N-terminale (Kleuss et Krause, 2003). Il n'y a pas de séquence consensus spécifique d'une palmitoylation même si des sites peuvent être prédits (Zhou *et al*, 2006).

L'isoprénylation est l'addition de chaînes farnésyl (C15) ou géranylgeranyl (C20) sur une cystéine au voisinage de l'extrémité C-terminale. La séquence consensus est CAAX (Cys-acide aminé aliphatique-acide aminé aliphatique-X) où X détermine si la cystéine est farnésylée (X= Met, Ser) ou géranylgeranylée (X= Leu) (Sebti, 2005).



Ces modifications représentent des mécanismes importants dans le ciblage des protéines membranaires (membrane plasmique ou membranes subcellulaires), dans leur interaction avec des protéines régulatrices, mais également dans le contrôle de leur activité (Magee et Seabra, 2005).

Au cours de l'apoptose, les caspases clivent des substrats spécifiques, générant pour certains, une glycine en N-terminale de la protéine, susceptible de subir une myristoylation morbide. Les fragments N-myristoylés générés sont ensuite adressés aux mitochondries où ils activent des signaux apoptotiques (Utsumi *et al*, 2003 ; Vilas *et al*, 2006). Prenons l'exemple de la protéine PAK2, une petite GTPase qui régule différentes fonctions du cytosquelette. Pendant l'apoptose, PAK2 est clivée par la caspase-3 puis myristoylée, ce qui relocalise la protéine du cytoplasme au niveau de la membrane plasmique et des membranes intracellulaires. Elle stimule la voie de signalisation du stress impliquant JNK et induit la mort cellulaire. Les myristoylations post-traductionnelles des protéines clivées par les caspases et intervenant dans la dynamique du cytosquelette est un mécanisme expliquant la régulation des événements tardifs de l'apoptose (Vilas *et al*, 2006 ; Sakurai et Utsumi, 2006).

Les fragments N-myristoylés adressés aux mitochondries peuvent également activer indirectement ces signaux apoptotiques, par le biais de l'activation d'enzymes impliquées dans le métabolisme mitochondrial. La dihydrocéramide $\Delta 4$ -désaturase 1 (DES1) est clivée par les caspases dans les hépatocytes de rat. Cette protéolyse génère une glycine libre d'être myristoylée. L'enzyme est ensuite dirigée vers les mitochondries. Dans les cellules COS-7, l'enzyme myristoylée en N-terminal est dirigée vers les mitochondries où elle catalyse la transformation du dihydrocéramide en céramide. Le céramide interagit avec les chaînes de transport d'électrons dans les mitochondries pour induire la production de ROS (Reactive oxygen species), former des canaux dans la membrane externe mitochondriale, et induire le relargage de molécules apoptotiques dans le cytosol et donc la lipo-apoptose (Beauchamp *et al*, 2009).

La mise en place d'une nouvelle technique plus sensible utilisant un analogue du myristate, le bio-orthogonal azidomyristate, et non plus du myristate radiomarqué, permet de détecter de plus en plus de protéines myristoylées suite au clivage par les caspases, suggérant ainsi que cette modification post-traductionnelle est un mécanisme répandu pour réguler la mort cellulaire (Martin *et al*, 2008).

L'ajout d'un palmitate sur une protéine permet également de réguler la mort cellulaire. La palmitoylation du facteur d'activation des plaquettes PAF dans les entérocytes active ce dernier et inhibe la voie PI3K/Akt, ce qui induit l'apoptose des cellules. L'utilisation d'un inhibiteur de la palmitoylation, le 2 bromo-palmitate, inactive PAF et par conséquent bloque le phénomène apoptotique (Lu *et al*, 2008).

Les protéines Rho appartiennent aux protéines de la famille Ras impliquées, entre autre, dans la régulation des signaux de transduction tels que p38, ERK, SAPK et dans la prolifération cellulaire. Rho B inhibe la prolifération cellulaire et a une activité pro-apoptotique lorsque sa cystéine 192 est palmitoylée et sa cystéine 193, prénylée. La mutation d'un seul de ces sites suffit à rendre la protéine inactive (Wang et Sebt, 2005).

Ainsi, de nombreuses protéines régulent les processus apoptotiques indirectement par l'activation ou l'inhibition de voies de transduction du signal.

Ces exemples font partie d'une liste non exhaustive des modifications post-traductionnelles par addition d'un groupe fonctionnel. A titre indicatif, il existe également l'acétylation, la glycosylation, la glycylation, la sulfatation, la sélélation, la glutamylation, la biotinylation, la méthylation...

1.2- Par addition de groupes peptidiques ou de protéines

1.2.1- L'ubiquitinylation

L'ubiquitinylation est une modification post-traductionnelle qui permet de fixer une ou plusieurs ubiquitines, protéine de 8 kDa, sur une ou plusieurs lysines acceptrices d'une protéine cible. Le processus d'ubiquitinylation a été mis en évidence dans les années 1980 par Aaron Ciechanover, Avram Hershko et Irwin Rose, ce qui leur a valu l'obtention du prix Nobel de chimie en 2004. Des isopeptidases, les protéases spécifiques des ubiquitines (USP : *Ubiquitin Specific Peptidase*) et les hydrolases de l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine (UCHs : *Ubiquitin C-terminal Hydrolases*), catalysent la réaction inverse et permettent la de-ubiquitinylation des protéines. Certaines semblent jouer un rôle direct dans la protéolyse des protéines ubiquitinylées par le protéasome 26S, en permettant le recyclage de l'ubiquitine (Papa et Hochstrasser, 1993 ; Stein *et al*, 1995). D'autres semblent être impliquées dans la de-ubiquitinylation des protéines pour stopper leur dégradation (Hedge *et al*, 1997).

L'ubiquitinylation s'effectue sur les résidus Lys de la protéine cible, mais dans de rares cas, il a été montré qu'elle était possible sur des résidus Cys, Ser et Thr (Cadwell et Coscoy, 2005). Il est également possible d'ubiquitinyler une protéine qui ne possède pas de Lys. Ce processus

est appelé « NH₂ ubiquitylation » : l'ubiquitylation se fait au niveau du groupement NH₂ du premier acide aminé à l'extrémité N-terminale de la protéine. Il existe une autre forme atypique d'ubiquitylation, la « règle de l'extrémité N-terminale ». Dans ce cas, le NH₂ terminal ne sert qu'à la reconnaissance de la protéine cible, l'ubiquitine étant ensuite transférée sur une lysine interne (Varshavsky, 2003).

Beaucoup de protéines dont la dégradation doit être rapide possèdent une séquence PEST, séquence enrichie en Pro, Glu, Ser et Thr (Rechsteiner et Rogers, 1996). Ces éléments font partie des sites consensus de phosphorylations de kinases (Yaglom *et al*, 1995). La phosphorylation de résidus dans la région PEST d'une protéine peut être requise pour sa dégradation comme c'est le cas pour la cycline D1 (Diehl *et al*, 1997). NF-κB, est un facteur de transcription impliqué dans de nombreux processus dont l'apoptose. Ce facteur est maintenu sous une forme latente dans le cytoplasme d'une cellule non stimulée par interaction avec son inhibiteur spécifique IκBα. Suite à une stimulation de type cytokines ou stress, IκBα doit être rapidement dégradée pour que NF-κB soit redirigée vers le noyau et exerce ses activités transcriptionnelles. Il induit, entre autre, la transcription d'inhibiteurs apoptotiques tels que Bcl-X_L, A1, cIAP1 (Chen *et al*, 2000 ; Zong *et al*, 1999 ; Wang *et al*, 1998). Cette dégradation d'IκBα implique qu'il soit phosphorylé au niveau des sites Ser32 et Ser36 pour son ubiquitylation (Hershko et Ciechanover, 1998) (Figures 17 et 19). Au contraire, la phosphorylation de c-Fos et c-Jun, des proto-oncogènes, évite leur ubiquitylation et leur dégradation (Okazaki et Sagata, 1995 ; Musti *et al*, 1997).

Les différentes conséquences d'une ubiquitylation résident dans la spécificité des substrats cibles. Les substrats modifiés par un ou plusieurs polymères d'ubiquitines seraient dirigés vers le protéasome 26S alors que ceux mono ou peu ubiquitylés seraient dégradés dans les lysosomes (Pickart, 2001). De plus, les substrats destinés au protéasome possèdent une chaîne de polyubiquitines reliées entre elles par la Lys 48 et la Gly 76, alors que ceux qui possèdent une chaîne de polyubiquitines reliées entre elles par des liaisons K63-G76, K11-Gly76 et K29-Gly76 ne sont pas impliqués dans un processus protéolytique (Chau *et al*, 1989 ; Spence *et al*, 2000).

La fonction première de cette modification post-traductionnelle est la dégradation des protéines ubiquitylées par le protéasome (Hershko et Ciechanover, 1998). Elle peut néanmoins être impliquée dans d'autres fonctions cellulaires telles que le remodelage de la chromatine (Osley, 2004), la réparation de l'ADN (Hoegge *et al*, 2002; Ulrich, 2004), les régulations de la localisation, signalisation et trafic intracellulaires (Hicke et Dunn, 2003), la régulation de la transcription (Levinger et Varshavsky, 1982), la synthèse protéique (Finley *et al*, 1989), le cycle cellulaire (Masamha et Benbrook, 2009).

Système ubiquitine-protéasome et apoptose

Le système ubiquitine-protéasome est primordial dans la régulation de la dégradation des protéines clés impliquées dans l'apoptose telles que p53, mdm2, I κ B α , Bax, Bad et les caspases. De plus les substrats clivés par les caspases peuvent être dégradés par ce mécanisme selon la règle du N-terminale (Melino, 2005).

Certaines molécules apoptotiques possèdent une activité ubiquitine-ligase, activité de fixation de l'ubiquitine à la protéine, grâce à un domaine RING (*Really Interesting New Gene*), ou domaine en doigt de zinc, situé à leur extrémité C-terminale (Vaux et Silke, 2005). Les inhibiteurs d'apoptose IAPs peuvent réguler la dégradation des caspases-3, 7 et 9 via le protéasome (Ditzel et Meier, 2005). L'inhibition de l'activité des caspases via l'ubiquitylation ne prévient pas la cellule de la mort puisque ces événements se situent après la perméabilisation de la membrane mitochondriale, qui constitue le point de non-retour du déclenchement apoptotique. L'activité ubiquitine-ligase des IAPs peut être maîtrisée par interaction avec son antagoniste Smac/Diablo ou par dimérisation (Melino, 2005). Les IAPs peuvent également provoquer leur propre destruction par auto-ubiquitylation (Taylor *et al*, 2005).

L'inhibition du protéasome initie l'apoptose (Henderson *et al*, 2005) et s'accompagne d'une stabilisation des protéines BH3-seulement. Le système ubiquitine-protéasome joue certainement un rôle très important en amont de la perméabilisation de la membrane mitochondriale en régulant la dégradation des protéines de la famille Bcl-2, et déterminerait ainsi si une cellule doit vivre ou mourir (Nikrad *et al*, 2005).

Johnson *et al* ont mis en évidence le caractère sélectif de dégradation d'une sous-unité protéique ou d'un complexe protéique, laissant la possibilité au complexe ou à la protéine de changer sa conformation (Johnson *et al*, 1990). C'est peut être cette propriété qu'utilise le système ubiquitine-protéasome pour transformer l'activité anti-apoptotique de Bfl-1, une protéine de la famille Bcl-2, en facteur pro-apoptotique (Kucharczak *et al*, 2005). Ce mécanisme pourrait contribuer à la compréhension des membres de la famille Bcl-2 qui peuvent à la fois avoir des effets anti et pro-apoptotiques.

L'activation des caspases peut se faire selon une voie extrinsèque et/ou une voie intrinsèque mitochondriale suite à une perméabilisation de la membrane mitochondriale et aux relargages de cytochrome c. Le système ubiquitine-protéasome peut empêcher ce relargage en ciblant les éléments régulateurs de l'apoptose tels que les protéines BH3-seulement (Bid, Bim, Bik) vers une dégradation, ou au contraire stimuler la mort en ciblant les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Mcl-1, Bcl-X_L, Bcl-2) (Thompson *et al*, 2008 ; Taylor *et al*, 2005). Il agit également à d'autres niveaux pour réguler la mort cellulaire programmée : en dégradant I κ B α , il active NF- κ B qui active alors la transcription de gènes anti-apoptotiques (A1, CIAP, FLIP) ; et en dégradant p53 et son ubiquitine ligase mdm2, il empêche l'activation des protéines BH3-seulement Puma et Noxa. Une inhibition du protéasome empêche la dégradation des membres pro et anti-apoptotiques et stimule l'activation des protéines BH3-seulement par activation de la p53, ce qui peut alors initier l'apoptose (Friedman et Xue, 2004 ; Taylor *et al*, 2005) (Figure 17).

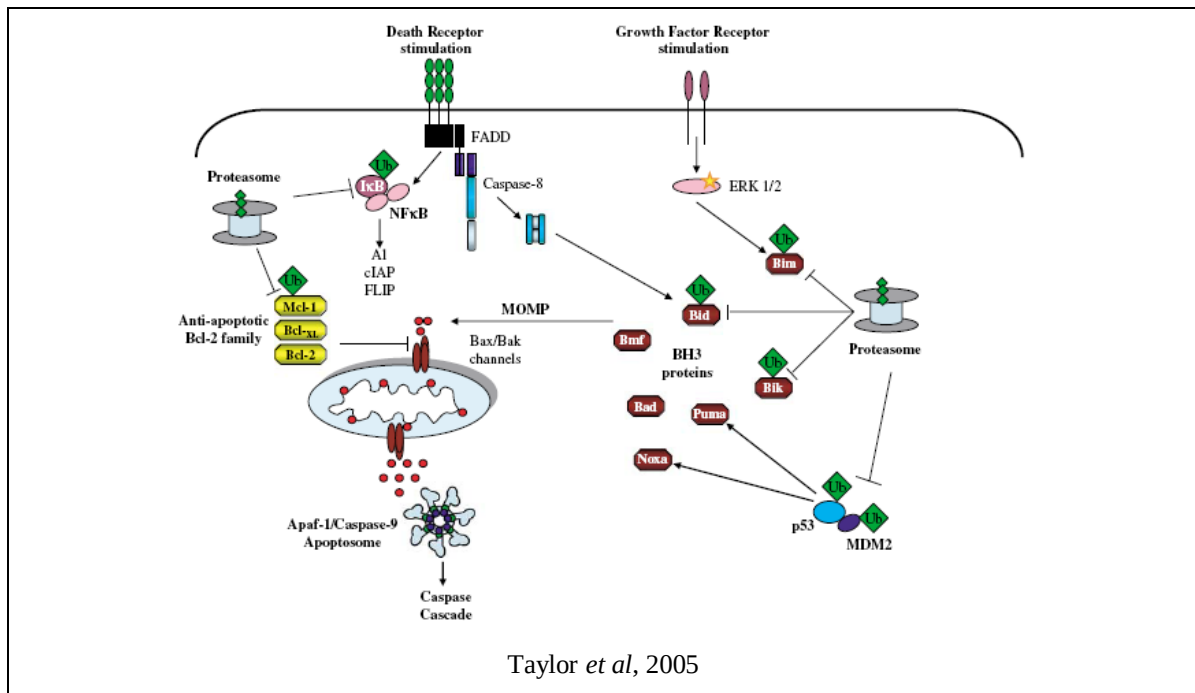


Figure 17 : Régulation de la mort cellulaire programmée par le système ubiquitine-protéasome

L'activation des caspases peut être induite selon 2 voies principales : la voie extrinsèque des récepteurs de mort qui vont activer la caspase-8 *via* la protéine adaptatrice FADD et la voie intrinsèque mitochondriale activée par les protéines BH3-seulement. Les 2 voies sont à l'origine du relargage du cytochrome c vers le cytosol, formant alors un complexe protéique, l'apoptosome, en recrutant Apaf-1 et la pro-caspase-9. Le système ubiquitine-protéasome peut bloquer le relargage du cytochrome c en dégradant les protéines régulatrices de la mort cellulaire telles que les protéines BH3-seulement (Bim, Bik et tBid), p53. En dégradant IκB, NF-κB peut activer la transcription de gènes anti-apoptotiques (A1, cIAP, FLIP). Le système ubiquitine-protéasome peut également induire la mort cellulaire en dégradant mdm2 et Mcl-1. Mdm2 ubiquitinylée stabilise p53 qui peut alors induire l'apoptose.

1.2.2- La sumoylation

La sumoylation a été découverte en 1996-1998 par les équipes de Gunter Blobel et Frauke Melchior. En 1999, Gunter Blobel a reçu le prix Nobel de physiologie ou médecine pour la découverte, au sein des protéines, de signaux intrinsèques qui gouvernent leur transport et leur localisation cellulaire. La sumoylation est le processus de fixation d'une protéine SUMO (*Small Ubiquitin-like MOdifier protein*), protéine de 10 kDa sur une lysine acceptrice d'une protéine cible. Des protéases, les SENP clivent ensuite SUMO de son substrat (Geiss-Friedlander et Melchior, 2007).

La sumoylation régule les propriétés biochimiques des protéines cibles (Figure 18): trafic nucléo-cytoplasmique (Pichler *et al*, 2002), interaction entre protéines (Geiss-Friedlander et Melchior, 2007), interaction ADN-protéine (Valin et Gill, 2007), régulation de la transcription (Seeler et Dejean 2003; Gill, 2005) stabilité protéique (Hilgarth *et al*, 2004), intégrité du génome (Hardeland *et al*, 2002).

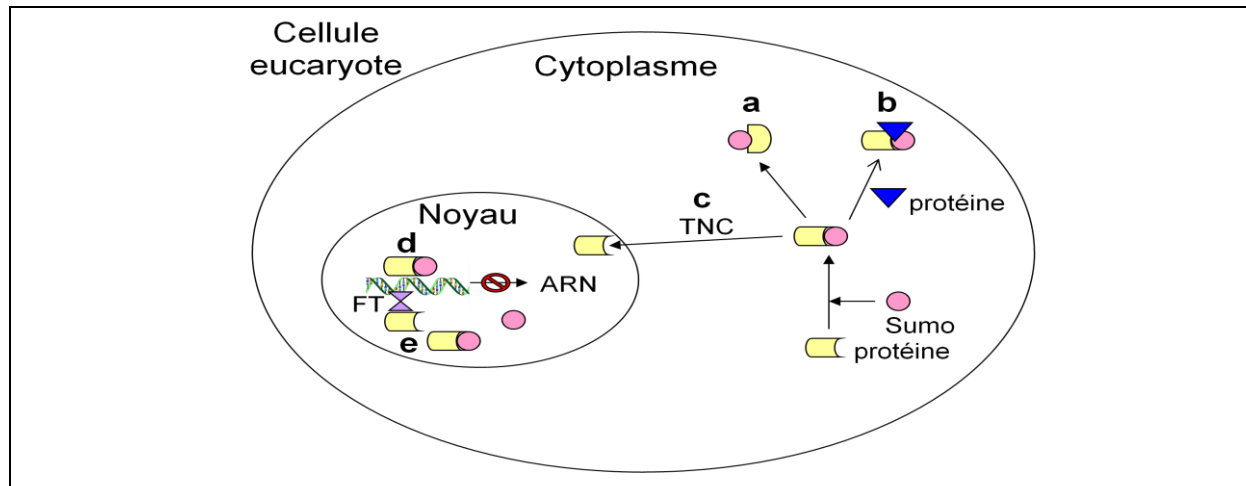


Figure 18 : Rôles d'une sumoylation dans une cellule eucaryote

La sumoylation d'une protéine peut engendrer diverses fonctionnalités. Elle peut modifier la conformation d'une protéine et modifier son activité, elle peut bloquer l'interaction de la protéine sumoylée avec son substrat (a). La sumoylation peut au contraire générer un site de liaison pour un substrat (b). Cette modification post-traductionnelle intervient également dans le trafic nucléocytoplasmique (c), l'interaction ADN-protéine (d) et la régulation de la transcription (e).

FT= Facteur de Transcription

TNC= Trafic Nucléo-Cytoplasmique

Les sites potentiels de sumoylation

La majorité des lysines modifiées par SUMO font partie d'une séquence consensus spécifique : Rh-K-X-E/D où « Rh » représente un résidu hydrophobe et « X » un acide aminé quelconque (Gill, 2005). Des motifs dérivés de cette séquence ont cependant été décrits, l'un dépend de la phosphorylation (PDSM pour *Phosphorylation Dependant Sumoylation motif*), l'autre dépend de la présence de charge négative (NDSM pour *Negatively charged amino-acid Dependant Sumoylation Motif*) (Hietakangas *et al*, 2006 ; Yang *et al*, 2006). La phosphorylation peut donc influencer sur la sumoylation (Hilgarth *et al*, 2004). Il arrive également parfois qu'une sumoylation ait lieu sur un site non-conventionnel (Pichler *et al*, 2005, Hoege *et al*, 2002).

Sumoylation et transport nucléaire

En fonction du substrat, la sumoylation peut avoir lieu dans le cytoplasme ou dans le noyau. Cette modification est impliquée dans la régulation de la localisation cellulaire des protéines. L'exemple le plus connu est celui de RanGAP1, protéine impliquée dans la régulation du transport des protéines ribonucléiques (Matunis *et al*, 1996 ; Mahajan *et al*, 1998). RanGAP1 est localisée principalement dans le cytoplasme. Associée à une protéine SUMO, elle est alors localisée au niveau des fibres cytoplasmiques des complexes des pores nucléaires (NPC : *Nuclear Pore Complex*) (Matunis *et al*, 1996). La sumoylation modifie la conformation de RanGAP1, ce qui lui permet alors de s'associer à la protéine RanBP2/Nup358 (Matunis *et al*, 1998). Certaines enzymes catalysant la réaction se situent au niveau des pores nucléaires, ce qui signifie que certaines protéines peuvent être sumoylées lorsqu'elles entrent dans le noyau servant ainsi à l'import dans le noyau de protéines cytoplasmiques ou bien à retenir ces protéines dans le noyau. Par exemple Nup358,

une protéine des pores nucléaires, possède une activité E3 ligase qui régule le transport de RanGAP1 au NPC (Melchior *et al*, 2003 ; Matunis *et al*, 1998). E2 (Ubc9) et SENP2 sont également présents au niveau de ces pores. L'enzyme E2, enzyme de conjugaison de la protéine SUMO, interagit avec Nup358 qui reconnaît RanGAP1-SUM1 formant ainsi un complexe stable, protégé de SENP2 (Pichler *et al*, 2002 ; Zhang *et al*, 2002).

La sumoylation est, la plupart du temps, impliquée dans l'import de protéine au noyau, mais il est possible qu'elle intervienne également au niveau de leur export. Une mutation de la lysine impliquée dans le site de sumoylation peut conduire à l'accumulation de la protéine dans le noyau (Sobko *et al*, 2002).

Sumoylation et apoptose

Pendant le processus apoptotique, les caspases induisent la fragmentation des compartiments cellulaires dont l'appareil de Golgi. Les caspases-3 et 8 clivent, entre autre, la protéine p115, protéine attachée aux vésicules golgiennes. Son clivage génère un fragment C-terminal qui est transloqué au noyau et qui amplifie la réponse apoptotique. Mukherjee et Shield ont montré qu'une séquence spécifique de ce fragment suffisait à induire l'activité apoptotique de la protéine et que cette séquence possède des sites de sumoylation. La sumoylation de p115 augmente l'efficacité de son clivage et son transport au noyau pour stimuler la réponse apoptotique (Mukherjee et Shield, 2009).

La sumoylation peut également affecter des facteurs ou cofacteurs de transcription et des protéines ayant un rôle important dans la régulation de la mort cellulaire, comme I κ B, l'inhibiteur de NF- κ B, p53 et mdm2. La sumoylation stabilise ces protéines par compétition directe avec le site d'ubiquitylation (Hay *et al*, 1999 ; Lee *et al*, 2006 ; Seeler et Dejean, 2003). Deux modifications post-traductionnelles différentes peuvent donc entrer en compétition pour augmenter le niveau de régulation d'une protéine (Desterro *et al*, 1998) (Figure 19). La phosphorylation peut intervenir dans cette régulation en favorisant l'une des modifications au profit de l'autre (Karin et Ben-Neriah, 2000). Prenons pour exemple le facteur de transcription NF- κ B, facteur de survie cellulaire (Figure 19). Nous avons vu partie II.1.2.1 concernant l'ubiquitylation, que NF- κ B est régulée indirectement par le système ubiquitine-protéasome. Son activation nécessite la phosphorylation de son inhibiteur I κ B α , phosphorylation qui entraîne son ubiquitylation puis sa dégradation par le protéasome 26S. En absence de phosphorylation, I κ B α est sumoylée, stabilisant ainsi le complexe NF- κ B /I κ B α et rendant NF- κ B inactive (Wang *et al*, 2009b).

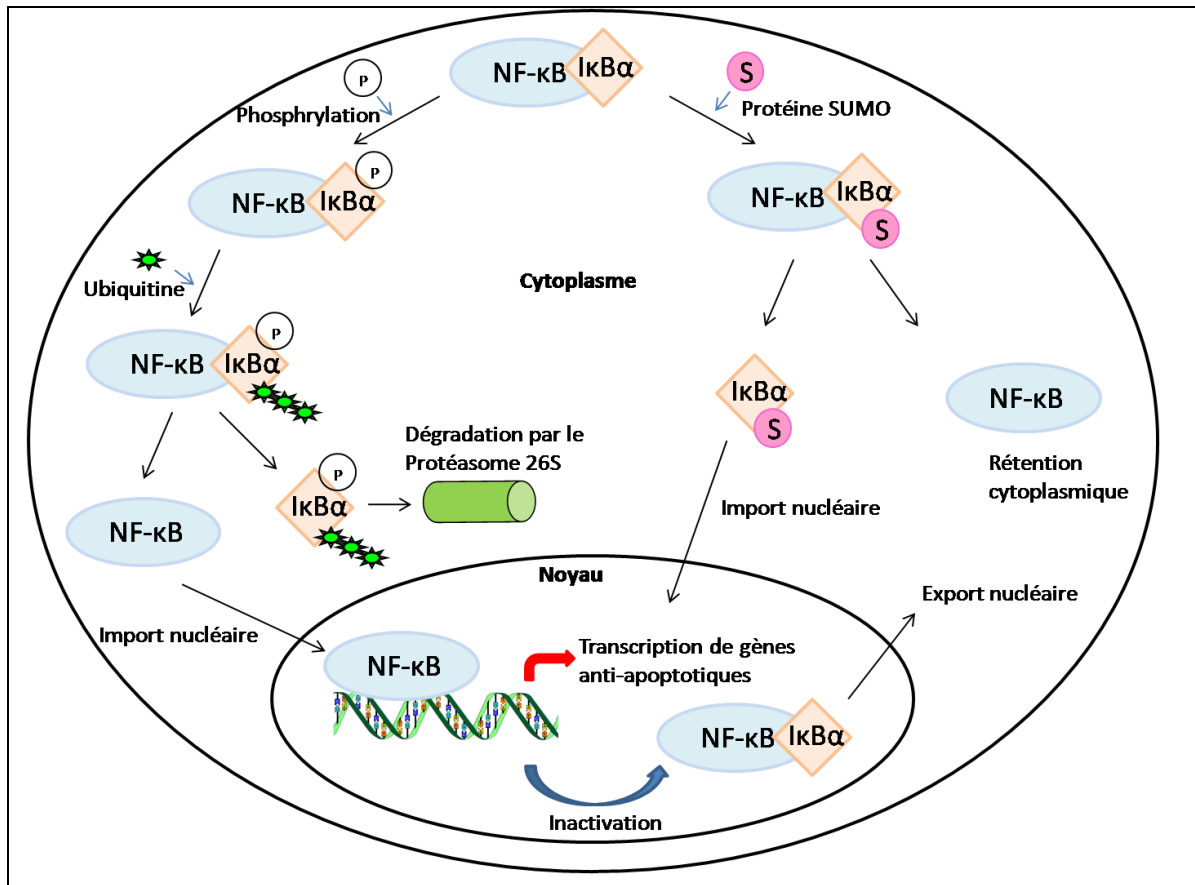


Figure 19 : Compétition sumoylation/ubiquitinylation : Exemple de NF-κB

NF-κB est un facteur de transcription qui est dans un état inactif dans le cytosol, dû à son interaction avec son inhibiteur IκBα. En fonction du stimulus reçu, IκBα va soit être phosphorylée, soit être sumoylée. Sa phosphorylation entraîne son ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome 26S. La molécule NF-κB est alors transloquée dans le noyau où elle active la transcription de gènes anti-apoptotiques. La sumoylation entre en compétition avec le site d'ubiquitinylation d'IκBα. Ce dernier n'étant pas libre, la protéine n'est plus un substrat du protéasome, ce qui fait qu'IκBα est stabilisée et va au noyau pour interagir avec NF-κB et arrêter la transcription de gènes anti-apoptotiques.

1.3- Par changements structuraux

1.3.1- Les ponts disulfures

Un pont disulfure est un lien covalent issu de l'oxydation des fonctions thiols de deux cystéines d'une protéine ou de deux cystéines de deux protéines différentes (Smithies, 1965).

La réaction se fait spontanément dans le milieu. Dans les protéines contenant un grand nombre de cystéines, l'agencement correct des ponts disulfures nécessite parfois l'intervention d'enzymes spécifiques. Ce processus est effectué par les protéines du réticulum endoplasmique rugueux (RER) et de la mitochondrie (Riemer *et al*, 2009). Le cytosol est un milieu réducteur alors que les compartiments cellulaires sont eux des milieux oxydants. Par conséquent, les protéines cytosoliques ont peu ou pas de ponts disulfures comparées aux protéines localisées dans les compartiments intracellulaires (Ostergaard *et al*, 2004).

Les protéines mitochondriales codées par le noyau sont synthétisées sous une forme de précurseurs, non structurés puis transloquées dans la mitochondrie. L'espace inter-membranaire des mitochondries contient beaucoup de protéines vitales pour la cellule telles que les protéines du métabolisme énergétique ou encore les molécules pro-apoptotiques (cytochrome c, AIF, Smac/Diablo). Ces dernières sont stockées dans l'espace inter-membranaire jusqu'à ce que la mort cellulaire soit induite (Van Gurp *et al*, 2003). Suite à leur synthèse dans le cytoplasme, les protéines de l'espace inter-membranaire mitochondrial sont dirigées différemment vers leur site d'activité, en fonction de la présence de signal d'adressage, de leur caractéristique et des composants utilisés pour la translocation (Herrmann et Hell, 2005). AIF et Smac/Diablo possèdent une pré-séquence bipartite à l'extrémité N-terminale de la protéine composée du peptide signal suivi d'une région hydrophobe. Elles sont transportées par les complexes TOM (*Translocase of the Outer Membrane*) et TIM (*Translocase of the Inner Membrane*) qui permettent respectivement de traverser les membranes externe et interne mitochondriales. Dans la membrane interne, les pré-séquences des protéines à destination inter-membranaire sont clivées et les protéines matures retournent dans l'espace inter-membranaire (Burri *et al*, 2005). Les protéines plus petites et qui ne possèdent pas de signal d'adressage tel le cytochrome c, diffusent à travers TOM sous une forme non structurée puis sont emprisonnées dans l'espace inter-membranaire sous une forme structurée (Nicholson et Neupert, 1989). Une fois dans l'espace inter-membranaire des mitochondries, les protéines stabilisent leur structure 3D en établissant des ponts disulfures grâce au « système mitochondrial de pont disulfure » (*Mitochondrial Disulfide Relay*) et ne sont alors plus capables de traverser la membrane externe mitochondriale (Bihlmaier *et al*, 2008). Dans les mitochondries, les résidus cystéines des protéines pourraient donc avoir un rôle dans la localisation cellulaire, dans la chaîne respiratoire mitochondriale, et dans l'apoptose.

La formation des ponts disulfures dans le réticulum endoplasmique (RE) est concomitante avec la translocation de la protéine. Elle est facilitée par des protéines disulfures isomérases comme la PDI (*Protein disulfide isomerase*) (Hatahet et Ruddock, 2009). La plupart des protéines transportées dans le RE sont des protéines membranaires ou sécrétrices (Ghaemmaghami *et al*, 2003). Dans le RE, le système d'oxydoréduction des résidus cystéines régulent entre autre, l'homéostasie calcique *via* les récepteurs aux IP3 (inositol 1, 4, 5-triphosphate) (Higo *et al*, 2005).

Le pont disulfure est un élément des structures tertiaire et quaternaire de la protéine. C'est une liaison qui stabilise la structure et régule l'activité des protéines (Riemer *et al*, 2009). Certaines protéines ne deviennent actives qu'après verrouillage de leur structure par des ponts disulfures (Simizu *et al*, 2007). Au contraire, les ponts disulfures peuvent être clivés dans les protéines matures, ce qui a des conséquences importantes sur la fonction des protéines. Par exemple, le clivage de deux des ponts disulfures sur les cinq initiaux de la plasmine, protéine impliquée dans la coagulation sanguine et la migration cellulaire, conduit à sa protéolyse et au relargage de l'extrémité N-terminale : l'angiotatine, inhibiteur de l'angiogénèse (Hogg, 2003).

Cependant les connaissances sur la fonction régulatrice de ces systèmes d'oxydoréductions notamment le système mitochondrial restent limitées. Actuellement la fonction de ces ponts disulfures dans les protéines apoptotiques mitochondriales n'a pas été élucidée.

1.3.2- Les clivages protéolytiques

Outre les modifications chimiques de leurs résidus, certaines protéines peuvent subir un clivage protéolytique par rupture d'une liaison peptidique. Les clivages protéolytiques sont un processus courant de maturation des protéines, influant leur activation/inactivation. Ils interviennent également dans les interactions entre protéines et peuvent être régulés par d'autres modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation (Pellegrini et Scorrano, 2007).

L'exemple classique de la protéolyse protéique dans le processus apoptotique est l'activation des caspases. Chaque caspase est synthétisée sous une forme zymogène puis est activée, entre autre, par protéolyse (Hengartner, 2000). Ce sujet a déjà fait l'objet d'une partie « descriptive » dans cette thèse (I.3), je développerai donc, dans cette partie, l'aspect régulation du processus apoptotique par protéolyse de différents substrats de caspases, notamment les kinases. L'activation de certaines kinases (PAK, JNK) semble à la fois jouer un rôle régulateur et un rôle effecteur dans la mort cellulaire, tandis que l'activation d'autres kinases (ERK, PKB) l'inhibe (Anderson, 1997). La mort cellulaire résulte donc de l'intégration de signaux divergents. Pour arriver à leur fin, les protéases ont plusieurs méthodes : amplifier un signal de mort (clivage de MEKK-1 : Zebrowski *et al*, 2006), relocaliser des protéines clés de la signalisation cellulaire (tBid : Degli Esposti *et al*, 2003) ou encore rentrer en compétition avec des protéines de la réparation de l'ADN (DNA-PKcs : Itoh et Horio, 2001).

Le phénomène apoptotique est contrôlé d'une part par la balance entre les protéines pro et anti-apoptotiques et d'autre part, par l'activation des kinases. En réponse à un stress cellulaire, les cellules activent diverses voies impliquant des kinases, toutes convergeant vers la transcription de gènes anti-apoptotiques (Kyriakis et Avruch, 1996). Des protéases spécifiques, essentiellement les caspases, clivent ces kinases et bloquent leur activité (Utz et Anderson, 2000). RIPK1 est une kinase qui possède un domaine de mort pouvant interagir avec TRADD, protéine liée au récepteur TNF-R1. Suite à la fixation de TNF sur le récepteur TNF-R1, RIPK1 active NF- κ B pour stimuler la transcription de gènes de survie, pour essayer de contrecarrer la mort. RIPK1 est la cible de la caspase-8. Son clivage inhibe la translocation nucléaire de NF- κ B (Stanger *et al*, 1995 ; Kelliher *et al*, 1998). La sérine-thréonine kinase Akt/PKB agit en aval de PI3K pour induire la survie cellulaire. Dans les cellules stimulées par Fas, cette kinase est clivée et parallèlement, son activité décroît (Widmann *et al*, 1998). De plus, Cardone et ses collègues ont montré que Akt phosphoryle la caspase-9 et régule négativement son activité protéasique (Cardone *et al*, 1998). Les SRKs sont des kinases impliquées dans la phosphorylation des protéines SR (protéines riches en dipeptides Ser et Arg), facteurs qui régulent l'épissage constitutif et alternatif des ARNm. L'épissage alternatif des pré-ARNm joue un rôle important dans la régulation de l'apoptose.

Par exemple, les cellules qui expriment Bcl-X_L sont protégées de la mort cellulaire alors que celles qui expriment Bcl-X_S, c'est-à-dire Bcl-X_L privée des domaines BH1 et BH2 sont plus sensibles à l'apoptose. Lors du processus apoptotique, les caspases clivent ces kinases, ce qui pourrait avoir un rôle important dans la régulation des protéines SR (Utz et Anderson, 2000).

Au contraire, l'activation de protéases va engendrer une protéolyse de kinases favorisant le processus apoptotique. *P21-Activated Kinase 2* (PAK2) est un substrat des caspases impliqué dans les changements morphologiques d'une cellule apoptotique (Rudel et Bokoch, 1997). La protéolyse de PAK2 engendre un domaine N-terminal de fixation à la p21 et un domaine C-terminal possédant une activité kinase constitutivement active. L'expression constitutive de cette kinase active le processus apoptotique et est associée aux changements morphologiques observés (Lee *et al*, 1997). La protéine *DNA dependant Protein Kinase* (DNA-PKcs) joue un rôle très important dans la réparation de l'ADN (Casciola-Rosen *et al*, 1995). Son clivage par la caspase-3 induit une réduction de son activité kinase et empêche la réparation de l'ADN (Le Romancer *et al*, 1996).

Dans une cellule apoptotique, la protéolyse d'ICAD par la caspase-3 active les endonucléases CAD qui dégradent alors l'ADN. Dans les cellules non apoptotiques, la pro-caspase-3 et ICAD ont une localisation à la fois nucléaire et cytoplasmique. ICAD nucléaire forme un hétérodimère avec CAD. Suite à une stimulation de la cellule par Fas, l'activation de la caspase-3 par clivage protéolytique est d'abord observée au niveau du cytoplasme puis au niveau du noyau. Simultanément la quantité d'ICAD dans le noyau diminue alors qu'elle est inchangée au niveau du cytoplasme. Ceci va donc dans le sens qu'ICAD est clivée par la caspase-3 active dans le noyau et qu'il doit exister des éléments régulateurs qui inhibent le clivage d'ICAD dans le cytoplasme. Ainsi, la localisation des caspases et de leurs substrats dans différents compartiments pourrait être un moyen de réguler l'apoptose. La transmission du signal apoptotique passerait alors par la translocation des protéines de et vers la membrane cellulaire, les mitochondries et le noyau. (Ramuz *et al*, 2003).

Les cathepsines, les calpaïnes et les protéases à sérine sont des protéases différentes des caspases, également impliquées dans l'induction, par des voies alternatives, de la mort cellulaire. Leur activité est dirigée vers des substrats communs aux caspases et entraîne des modifications morphologiques caractéristiques de l'apoptose (Fleury *et al*, 2002).

1.4- Par changement de la nature chimique des acides aminés : exemple de la citrullination

La citrullination est la réaction correspondant à la transformation d'une arginine d'une protéine en citrulline (Fearon, 1939). Cette réaction est catalysée par la peptidylarginine deiminase (PAD), enzyme qui dépend d'une forte concentration de calcium. Ce taux de calcium critique provient soit d'un phénomène extracellulaire soit d'un processus apoptotique (Klareskog *et al*, 2008). Cette modification post-traductionnelle a des conséquences importantes sur la structure de la protéine. En effet, l'arginine est un acide aminé chargé positivement à pH neutre tandis que la citrulline est neutre, ce qui change la charge globale de

la protéine, son point isoélectrique, ses liaisons ioniques et hydrogènes. La citrullination provoque donc la déstructuration de la protéine (György *et al*, 2006). La fonction de cette modification reste largement inconnue mais il semblerait que les protéines citrullinées soient plus susceptibles d'être dégradées par des protéases (György *et al*, 2006).

Dans une cellule en apoptose, p53 peut activer la transcription de PAD4 (Tanikawa *et al*, 2009). La forte concentration en calcium intracellulaire active les enzymes PAD qui vont alors catalyser la citrullination de plusieurs substrats tels la vimentine, les histones, la protéine nucléaire de 70 kDa de la lamina nucléaire. Ce mécanisme pourrait donc être, en partie, responsable des changements morphologiques de la cellule apoptotique (Asaga *et al*, 1998) (Figure 20). La vimentine est une protéine des filaments intermédiaires du cytosquelette. Sa polymérisation/dépolymérisation pourrait être régulée par des modifications post-traductionnelles telles que des phosphorylations/déphosphorylations et citrullinations. Ces changements modifient le point isoélectrique de la vimentine. Cette dernière perd alors ses capacités à se polymériser (vimentine soluble) ou alors à se dépolymériser (vimentine des filaments) (Asaga *et al*, 1998 ; Inagaki *et al*, 1989). La protéine nucléaire de 70 kDa est une protéine de la lamina nucléaire, réseau protéique fibreux de l'enveloppe nucléaire. Ce réseau est régulé par phosphorylation/déphosphorylation lors des mitoses. Une citrullination des protéines de cette lamina nucléaire, telle que la protéine nucléaire de 70 kDa pourrait être responsable de la fragmentation nucléaire lors du processus apoptotique (Mizoguchi *et al*, 1998). Une fois fragmenté, l'ADN devient alors accessible aux nucléases.

PAD peut également catalyser la citrullination des histones, ce qui a une conséquence directe sur la régulation génique (Wang *et al*, 2004). La modification des histones affecte la stabilité du nucléosome : les histones citrullinées se dissocient de l'ADN, ce qui rendrait également l'ADN plus accessible aux nucléases (Nakashima *et al*, 2002 ; Vossenaar *et al*, 2003).

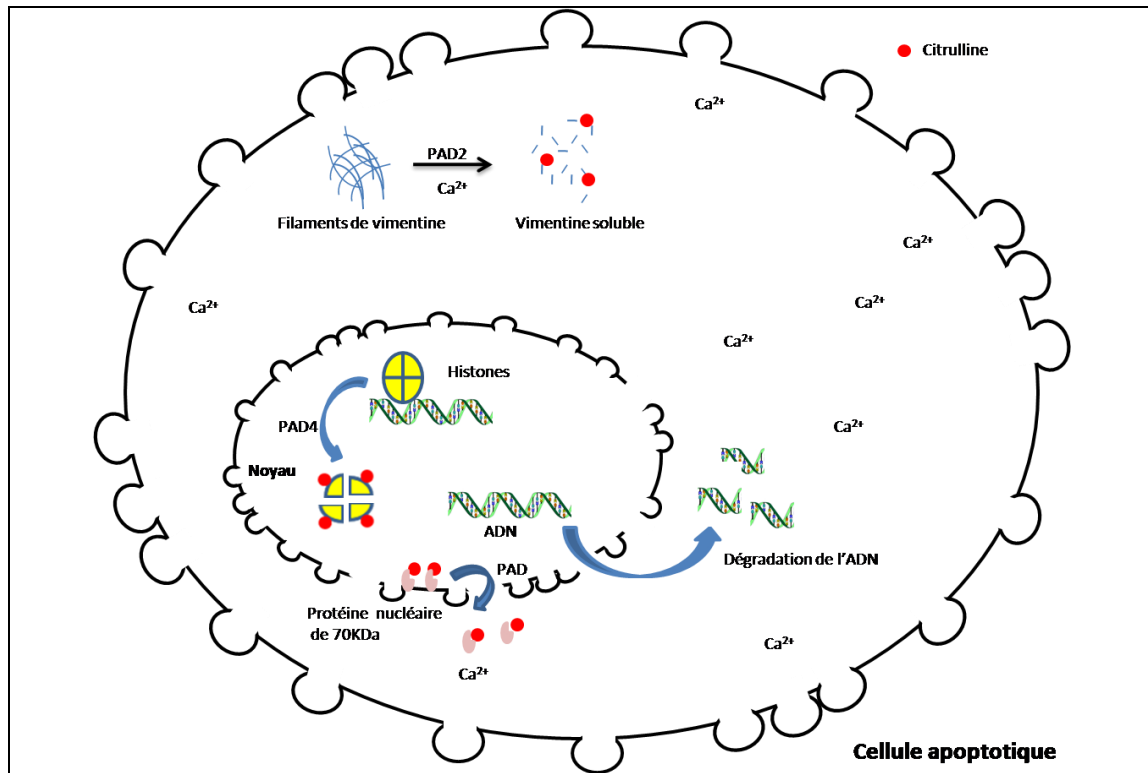


Figure 20 : Citrullination de protéines dans une cellule apoptotique

Le déclenchement de l'apoptose augmente la concentration en calcium intracellulaire, qui a pour conséquence d'activer les peptidylarginine déiminases (PAD). La citrullination des protéines pourrait être, en partie, à l'origine de changements morphologiques observés dans une cellule apoptotique. Par exemple, la vimentine citrulinée désorganise le cytosquelette. De même, la protéine nucléaire de 70 kDa citrulinée désorganise la membrane nucléaire et pourrait avoir un rôle dans la fragmentation nucléaire. Quant à la citrullination des histones, elle faciliterait la dégradation de l'ADN en le rendant plus accessible aux nucléases.

2- Régulation de l'activité apoptotique par adressage cellulaire et modifications post-traductionnelles

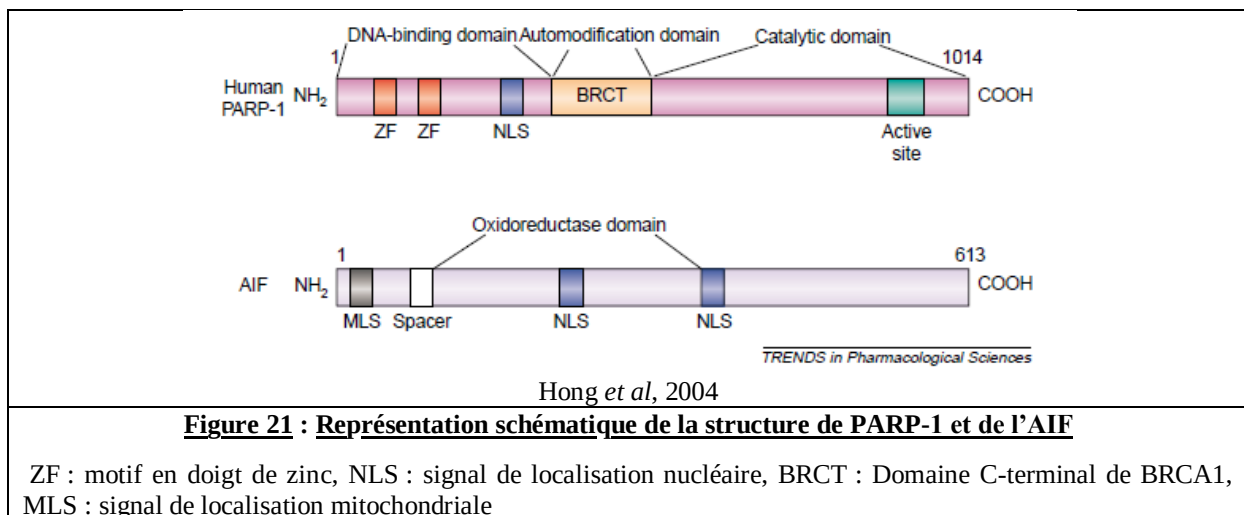
L'apoptose est régulée par des changements de la distribution cellulaire de protéines pro et anti-apoptotiques. Un stress apoptotique va induire, par exemple une redistribution des protéines nucléaires Histone H1, nucléophosmine, p53, caspase-2, Nur77 dans le cytosol (Lindenboim *et al*, 2010). D'autre part, l'induction de l'apoptose se déroule principalement dans le noyau, les mitochondries et le réticulum endoplasmique. Il existe donc un dialogue entre ces compartiments permettant de transmettre l'information dans la cellule.

La protéine Nur77 est un récepteur orphelin impliqué dans la survie cellulaire lorsqu'il est localisé dans le noyau, mais induit la mort cellulaire par apoptose lorsqu'il est adressé aux mitochondries. Pour cela, il convertit l'activité anti-apoptotique de Bcl-2 en activité pro-apoptotique (Lin *et al*, 2004). L'adressage de Nur77 est régulé par modification post-traductionnelle et par interaction avec le récepteur aux rétinoïdes RXR. La phosphorylation de Nur77 par JNK redirige la protéine vers les mitochondries alors que sa phosphorylation par Akt est responsable de sa rétention nucléaire (Han *et al*, 2006). La

phosphorylation de son récepteur RXR induit l'interaction du complexe Nur77-RXR avec l'exportine CRM1 et le transport de Nur77 au noyau (Cao *et al*, 2004).

A l'image de Nur77, TR3 est également un récepteur orphelin dont l'adressage cellulaire est régulé par phosphorylation. Dans le noyau, il régule positivement et négativement l'expression de gène en agissant comme facteur de transcription mais possède un effet pro-apoptotique suite à sa relocalisation dans les mitochondries de cellules cancéreuses gastriques. La phosphorylation, par Akt, de TR3 bloque son adressage mitochondrial (Chen *et al*, 2008). Akt favorise ainsi la survie cellulaire.

L'exemple le plus classique de la conversion entre noyau et mitochondries est celui de PARP-1/AIF. PARP-1 activée initie un signal nucléaire apoptotique qui se propage aux mitochondries et provoque le relargage de l'AIF. L'AIF est ensuite redirigée vers le noyau et induit une condensation de la chromatine, une large fragmentation de l'ADN et la cytotoxicité cellulaire (Hong *et al*, 2004). Ces deux agents apoptotiques sont adressés au noyau *via* un signal de localisation nucléaire. PARP-1 possède un NLS bipartite (Schreiber *et al*, 1992) alors que l'AIF possède deux séquences d'adressage nucléaire (Gurbuxani *et al*, 2003) (Figure 21).



La translocation nucléaire de Bok, une protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2 induit l'apoptose (Bartholomeusz *et al*, 2006). Bok possède une séquence riche en Leucine, indicatrice d'un signal d'export nucléaire dans son domaine BH3. L'utilisation de leptomycine, un inhibiteur spécifique de l'exportine Crm1, active l'effet apoptotique par augmentation de la concentration nucléaire de Bok. On ne sait, en revanche, pas comment elle est adressée au noyau.

Bcl-2 et Bax sont également retrouvées dans le noyau. Aucune d'entre elles n'a de signal de localisation nucléaire. Elles interagiraient avec une protéine possédant une séquence de translocation. Bcl-2 interagit avec la protéine chaperonne BAG-1, qui contient une telle séquence (Hoetelmans *et al*, 2000). Bcl-2 nucléaire affecte le transport nucléaire de facteurs de transcription, entre autre NF- κ B (Massaad *et al*, 2004). Bcl-2 est clivée par la caspase-3, éliminant ainsi son domaine BH4 nécessaire à l'interaction avec la protéine chaperonne

Généralités – Régulation des protéines apoptotiques de la famille Bcl-2 Par modifications post-traductionnelles

FKBP38 pour son adressage mitochondrial (Portier et Taglialatela, 2006). Cette élimination convertit Bcl-2 en une protéine pro-apoptotique de type Bax.

La phosphorylation de la sérine 15 de p53 nucléaire augmente la translocation de Bax au noyau (Morris *et al*, 2001 ; Gill *et al*, 2008). Dans le noyau p53 et Bax interagissent pour induire l'apoptose (Raffo *et al*, 2000). Les cellules résistantes à l'apoptose sont associées à une altération de la régulation de la localisation nucléaire de Bax. Le traitement de ces cellules par un agent alkylant (BCNU) accumule Bax dans le noyau et rétablit la mort cellulaire (Joy *et al*, 2000).

De plus en plus de membres de la famille Bcl-2 sont associés à une fonction nucléaire apoptotique et non plus à une fonction exclusivement mitochondriale. Néanmoins, à l'heure actuelle, peu d'éléments sont connus quant à leur transport vers le noyau. Il semblerait que peu d'entre elles utilisent le système classique de transport nucléaire des protéines à savoir les importines. Seule une variante de Mcl-1, zfMcl-1a, a été rapportée chez la carpe, comme contenant un signal de localisation nucléaire classique (Chen *et al*, 2000). Hormis les peptides signaux et les interactions avec une protéine contenant un signal d'adressage nucléaire, les membres de la famille Bcl-2 pourraient être véhiculés vers le noyau *via* des vésicules lipidiques. Dans le cytoplasme de cellules pancréatiques, de telles vésicules contenant la protéine mitochondriale mHSP70 ont été mises en évidence, suggérant alors un transport de protéines mitochondriales par vésiculation des mitochondries (Krause et Krupinska, 2009). Bax pourrait induire cette vésiculation par activation de l'Endophiline B1/Bif-1 (Rostovtseva *et al*, 2009).

3- Régulation des protéines apoptotiques de la famille Bcl-2 par modifications post-traductionnelles.

L'apoptose requiert des modifications rapides de protéines pour répondre à un changement brutal de l'environnement intracellulaire et extracellulaire. Même si la régulation du processus apoptotique passe par de multiples voies de signalisation cellulaire, il n'en reste pas moins que les acteurs décisifs de ce phénomène sont les membres de la famille Bcl-2. Dans la dernière partie de ces généralités, j'ai donc choisi, comme modèle de régulation des galigines, de développer la régulation des protéines apoptotiques de la famille Bcl-2 par modifications post-traductionnelles.

3.1- Les membres anti-apoptotiques

La surexpression de Bcl-2 bloque la plupart des stimuli apoptotiques et inhibe l'activation de Bax (Murphy *et al*, 2000). Il n'est donc pas étonnant que la cellule déploie diverses stratégies visant à réduire l'activité de cette protéine mais également des membres anti-apoptotiques de la même famille. Les protéines de la famille Bcl-2 sont souvent régulées par des modifications post-traductionnelles qui contrôlent leur activité, leurs localisations subcellulaires et leur demi-vie.

3.1.1- Mcl-1

Mcl-1 et protéines pro-apoptotiques

Mcl-1 joue un rôle critique dans la régulation de la mort cellulaire programmée en empêchant une activation inappropriée de Bax et Bak (Willis *et al*, 2005). Elle interagit en séquestrant Bak (Cuconati *et al*, 2003). Dans une cellule saine, Bak est associée avec Mcl-1 et Bcl-X_L et non avec Bcl-2. Cette interaction requiert le domaine BH3 de Bak, également nécessaire pour son oligodimerisation et pour induire la mort de la cellule. Dans une cellule apoptotique, les protéines à domaine BH3 sont activées et séparent le complexe Mcl-1-Bak (Willis *et al*, 2005). Mcl-1 doit donc être dégradée ou neutralisée. Cette dégradation s'effectue *via* le protéasome (Nijhawan *et al*, 2003) et est stimulée par la surexpression de certaines protéines BH3-seulement dont Noxa. Noxa, en interagissant avec Mcl-1, pourrait libérer Bak et induire la dégradation de Mcl-1 (Willis *et al*, 2005). D'autres protéines à domaine BH3-seulement stabilisent Mcl-1 mais induisent quand même la mort de la cellule. C'est le cas de Puma et Bim qui neutralisent la fonction anti-apoptotique de Mcl-1 en interagissant avec elle (Chen *et al*, 2005 ; Gomez-Bougie *et al*, 2005). Si seule la neutralisation de Mcl-1 est suffisante à induire la mort de la cellule, sa dégradation n'est pas strictement requise. Il est possible que cette dégradation dépende d'un stimulus spécifique tel qu'un dommage de l'ADN, ce qui garantirait un engagement à caractère irréversible du processus apoptotique dans de telles cellules. Ceci dit, la mort cellulaire induite par Bak requiert également la neutralisation de Bcl-X_L (Willis *et al*, 2005).

Mcl-1 et ubiquitinylation

Mcl-1 est donc une protéine décisive dans l'induction de la mort. Comme beaucoup de molécules apoptotiques, pour répondre rapidement à des événements intra ou extracellulaires, ces protéines ont une durée de vie courte (Yang *et al*, 1995). Mule est une E3-ligase qui possède un domaine BH3 similaire à celui de Bak et qui lui permet de cibler Mcl-1. Mcl-1 est ainsi ubiquitinylée par l'E3-ligase Mule (Zhong *et al*, 2005) et dégradée par le protéasome. Mcl-1 possède des séquences PEST, qui pourraient expliquer cette demi-vie courte et sa dégradation par le protéasome (Michels *et al*, 2005). Rappelons le, ces éléments font partie des sites consensus de phosphorylations de kinases (Yaglom *et al*, 1995). Mcl-1 peut subir diverses phosphorylations médiées par différentes voies de signalisations en fonction de l'état « sain » ou apoptotique de la cellule. Par exemple, dans une cellule « saine », le TPA induit la phosphorylation d'un site consensus ERK dans la région PEST (T163), ce qui diminue la dégradation de Mcl-1. La stimulation par de l'acide okadaïque, inhibiteur des phosphatases PP1 et PP2A, induit une multiple phosphorylation indépendamment de ERK, sur des sites différents (Domina *et al*, 2004). La phosphorylation de Mcl-1 par JNK au niveau des S121 et T163, suite à un stress oxydatif diminue son activité anti-apoptotique sans pour autant altérer sa stabilité (Inoshita *et al*, 2002). Selon la nature du stimulus et la voie de signalisation

impliquée, Mcl-1 peut subir une multitude de régulations post-traductionnelles *via* la phosphorylation. Ces phosphorylations, par le biais des régions PEST, régulent la dégradation de Mcl-1.

Mcl-1, phosphorylation et ubiquitinylation

Mcl-1 est une protéine anti-apoptotique importante induite en réponse à des facteurs de survie. Maurer et ses collègues se sont intéressés à la réponse de Mcl-1 dans des cellules dépendantes d'IL-3 et privées de ce facteur de croissance. Dans ces cellules, le taux de protéine Mcl-1 diminue parallèlement à la perméabilisation de la membrane mitochondriale. Cette perte de Mcl-1 n'est pas directement liée à la mort puisque une surexpression de Bcl-X_L dans ces cellules privées d'IL-3, empêche la mort de la cellule mais pas l'élimination de Mcl-1. Dans ces cellules, la privation d'IL-3 induit l'inactivité d'Akt et conséquemment la réduction de GSK-3 (Glycogen synthase kinase 3) sous forme phosphorylée au profit de la forme active non phosphorylée (Figure 22). Une addition d'IL-3 ou d'un inhibiteur de GSK-3 permet de prévenir l'apoptose par une réactivation d'Akt. La perte de Mcl-1 est associée à la privation d'IL-3 ou l'inhibition de GSK3. Une activation constitutive d'Akt ou une inhibition de GSK3 permet de maintenir un taux stable de Mcl-1, ce qui est davantage en faveur d'une régulation traductionnelle de la demi-vie plutôt que d'une régulation transcriptionnelle. De plus, Mcl-1 possède un site consensus de phosphorylation par GSK-3 au niveau de la Ser159. L'anticorps ne reconnaît spécifiquement cette forme phosphorylée de Mcl-1 que si les cellules sont traitées avec PI3K et un inhibiteur du protéasome MG-132, alors qu'il ne reconnaît pas la forme mutée sur la Ser159 en Ala (Mcl-1^{S159A}). Ceci indique que Mcl-1 phosphorylée sur la Ser159 est rapidement dégradée. Si on bloque la voie PI3K, seule la protéine sauvage est ubiquitinylée. La phosphorylation de Mcl-1 par GSK-3 induit sa dégradation *via* le système ubiquitine-protéasome (Maurer *et al*, 2006).

De part la durée de vie courte de Mcl-1 et sa dégradation possible par le protéasome, les leucémies qui dépendent d'une surexpression de Mcl-1 seraient plus sensibles aux agents chimiothérapeutiques que les leucémies qui dépendent d'une surexpression de Bcl-2 (Brunelle *et al*, 2009).

Généralités – Régulation des protéines apoptotiques de la famille Bcl-2 Par modifications post-traductionnelles

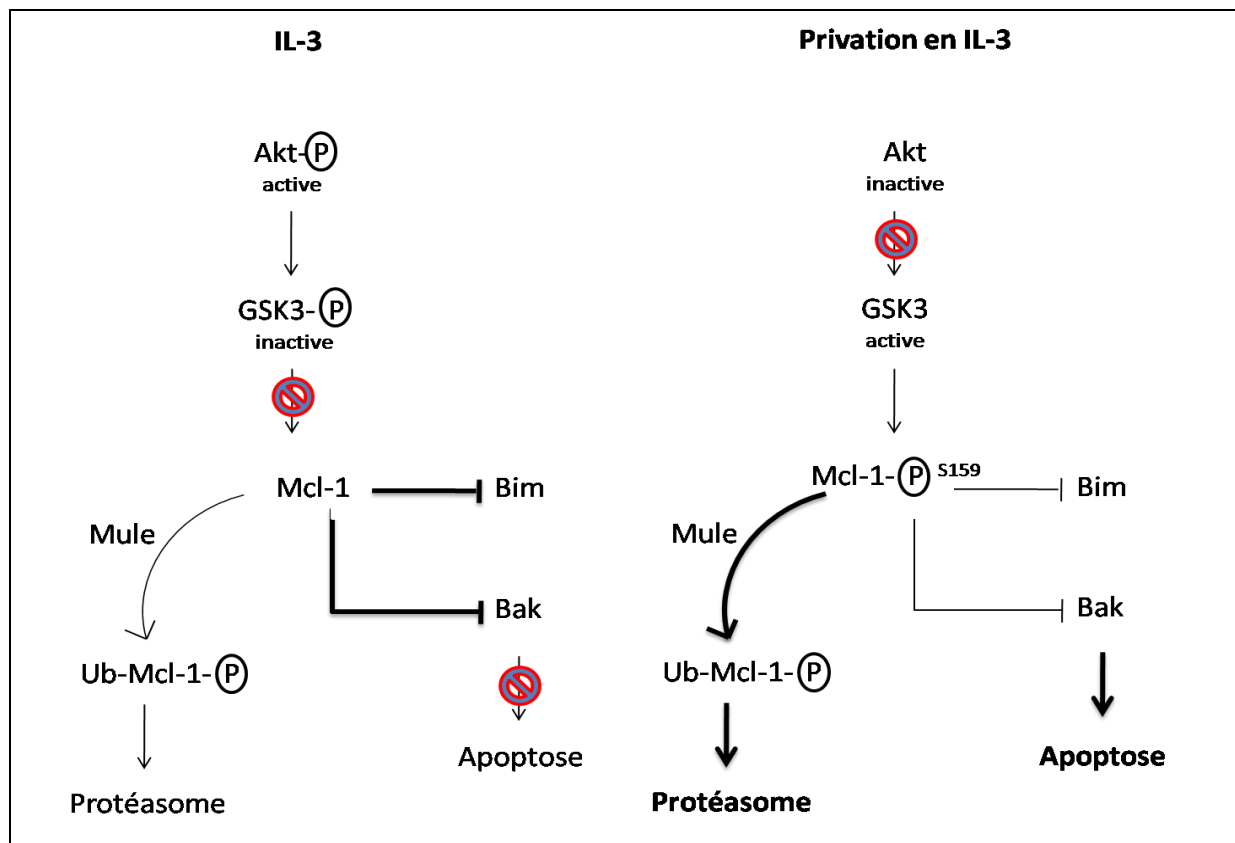


Figure 22 : Régulation de la stabilisation de Mcl-1 par GSK3

Dans les cellules stimulées par le facteur de croissance IL-3, Akt est active sous une forme phosphorylée et inactive GSK3 en la phosphorylant sur sa Ser N-terminale. GSK3 inactive ne peut alors pas phosphoryler Mcl-1, ce qui évite son ubiquitinylation par Mule et donc sa dégradation par le protéasome. Cette forme stable de Mcl-1 peut alors interagir et séquestrer les membres pro-apoptotiques tels que Bim et Bak bloquant ainsi l'induction de l'apoptose. Dans une cellule privée de facteur de croissance, Akt n'est pas active, empêchant ainsi GSK3 d'être phosphorylée. GSK3 peut alors phosphoryler Mcl-1 qui est ensuite reconnue et ubiquitinylée par Mule entraînant alors sa dégradation via le protéasome. Cette perte de Mcl-1 ne suffit pas en elle-même à induire la mort de la cellule mais elle la sensibilise aux protéines BH3-seulement.

Mcl-1 et clivages protéolytiques

En induisant l'apoptose dans des cellules de leucémie lymphoïde chronique avec du Bis-indolylmaleimide IX, Snowden et collaborateurs ont remarqué une altération du ratio Bcl-2/Bax et une translocation de Bax à la mitochondrie. En parallèle, ces événements sont accompagnés d'une perte de Mcl-1 qui coïncide avec l'apparition d'une forme clivée d'environ 28 kDa. Ce fragment généré possède une fonction pro-apoptotique capable d'accroître le processus de mort cellulaire (Snowden *et al*, 2003). La perte de Mcl-1 et l'apparition de la forme clivée, peuvent être, toutes deux, inhibées en présence de Zvad-fmk, un inhibiteur spécifique des caspases. Les caspases-3 et 7 sont responsables de ce clivage, avec une efficacité plus importante pour la caspase-3 (Snowden *et al*, 2003).

Mcl-1 peut être clivée au niveau des Asp 127 et Asp 157 générant, en fonction de l'Asp clivé, des fragments de 24 et 12 kDa ainsi que des fragments de 19 et 17 kDa. Cet effet peut être inhibé en utilisant des inhibiteurs spécifiques de caspases. La mutation de l'Asp 127 et de

l'Asp 157 en alanine empêche de générer les fragments de 24 et 12 kDa et les fragments de 19 et 17 kDa respectivement. Dans les cellules HeLa, Mcl-1 sauvage et Mcl-1 délétée des 127 acides aminés N-terminaux (Mcl-1 Δ 127) possèdent une distribution cellulaire différente. Mcl-1 sauvage est localisée au niveau de la face interne de la membrane plasmique alors que Mcl-1 Δ 127 est mitochondriale, associée avec la protéine anti-apoptotique Bim EL. De plus, cette coupure protéolytique entraîne la perte du domaine BH4 requis pour sa fonction anti-apoptotique. Cette forme clivée ressemble aux protéines pro-apoptotiques de type Bax et interagit davantage avec Bim comparé à la forme sauvage. D'autres membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, dont Bcl-2, sont également clivés dans la partie N-terminale et deviennent alors des molécules pro-apoptotiques (Cheng *et al*, 1997). Herrant et collaborateurs n'avaient pas réussi à démontrer une activité pro-apoptotique et pensaient que l'induction de la mort suite à ce phénomène était davantage liée à la perte de la fonction anti-apoptotique de Mcl-1 (Herrant *et al*, 2004). Récemment, il a été mis en évidence que la forme clivée Mcl-1 Δ 127 interagit avec Bax et non Bak pour induire l'apoptose (Ménoret *et al*, 2009). Cette interaction, *via* le domaine BH3 de Mcl-1 Δ 127, provoque la translocation de Bax du cytosol vers la mitochondrie puis induit une apoptose dépendante des caspases.

L'ensemble de ces modifications post-traductionnelles conditionne l'interaction de Mcl-1 avec les protéines BH3-seulement, régulant ainsi le processus apoptotique.

3.1.2- Bcl-X_L

Bcl-X_L et phosphorylation.

Suite à un dommage de l'ADN ou à une stimulation par TNF α ou Fas, les SAPKs (appelées également JNKs) sont activées et transloquées vers les mitochondries où elles s'associent avec Bcl-X_L. Elles phosphorylent Bcl-X_L sur les Thréonines 47 et 115 et induisent l'apoptose. Des mutants de Bcl-X_L, abolissant ces phosphorylations (Bcl-X_L^{T47A T115A}), sont résistants à la mort cellulaire (Kharbanda *et al*, 2000). Cependant, le rôle de cette phosphorylation dans le déclenchement de l'apoptose n'est pas connu. Elle n'intervient pas dans la libération de Bax du complexe Bcl-X_L-Bax puisque la phosphorylation a lieu au niveau des mitochondries, hypothèse confirmée par les expériences de Kharbanda et ses collaborateurs.

L'homéostasie est la balance entre la prolifération cellulaire et la mort cellulaire. Les cellules prolifèrent selon un cycle cellulaire, régulé par des cdk (*cyclin-dependant kinase*) alors que la mort cellulaire programmée est régulée par les membres de la famille Bcl-2 (Morgan, 1995 ; Reed, 1998). Il est maintenant admis que plusieurs membres de la famille Bcl-2 dont Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1 et même Bid ont un rôle dans la régulation du cycle cellulaire ainsi que dans les voies de réparation de l'ADN (Borner, 1996 ; Komatsu *et al*, 2000 ; Saintigny *et al*, 2001 ; Fujise *et al*, 2000, Jamil *et al*, 2005 ; Kamer *et al*, 2005 ; Zinkel *et al*, 2005). Les cellules induisent leur apoptose ou arrêtent le cycle cellulaire à des phases spécifiques du cycle cellulaire en réponse à un dommage de l'ADN. La progression de la phase G2 à la mitose M est régulée par des kinases à Sérine/Thréonine: les cdk1 (Draetta et Beach, 1988).

Généralités – Régulation des protéines apoptotiques de la famille Bcl-2 Par modifications post-traductionnelles

Récemment, Bcl-X_L a été identifiée comme pouvant être co-localisée avec cdk1 dans les nucléoles. Bcl-X_L interagit avec cdk1 et l'inhibe, suite à un dommage de l'ADN (Schmitt *et al*, 2007). L'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 engendre des perturbations cellulaires et par défaut, conduit à l'apoptose (Castedo *et al*, 2002). Dans des événements mitotiques normaux, Bcl-X_L serait sous forme phosphorylée, au niveau des thréonine 47 et sérine 62, pour exercer sa fonction anti-apoptotique. Suite à un dommage de l'ADN, Bcl-X_L est déphosphorylée et inhibe cdk1, ce qui stoppe le cycle cellulaire et conduit à l'apoptose de la cellule (Du *et al*, 2005 ; Schmitt *et al*, 2007).

La régulation de Bcl-X_L, tout comme les autres membres apoptotiques est extrêmement complexe. Sa phosphorylation doit dépendre d'autres éléments régulateurs permettant, entre autre, de contrôler sa localisation cellulaire.

Bcl-X_L et désamidation

La désamidation est une modification post-traductionnelle spontanée dans laquelle la fonction amide d'une asparagine ou d'une glutamine est éliminée et remplacée par un groupement carboxylate (Stephenson et Clarke, 1989). C'est un autre processus qui permet de limiter la durée de vie des protéines (Robinson et Robinson, 2001).

Dans des thymocytes normaux, un dommage de l'ADN augmente l'activité de NHE-1, un échangeur Na⁺/H⁺, ce qui modifie le pH intracellulaire de la cellule et provoque la désamidation non enzymatique de Bcl-X_L. Cette désamidation correspondant à la conversion d'une asparagine en isoaspartate, résulte en un changement de conformation de la protéine. Une telle altération réduit la capacité de Bcl-X_L à séquestrer et inhiber les protéines pro-apoptotiques à domaine BH3-seulement, provoquant ainsi l'apoptose des cellules (Deverman *et al*, 2002 ; Zhao *et al*, 2007). Une mutation des kinases impliquées dans la voie JAK/STAT est associée à une inhibition de la désamidation de Bcl-X_L et donc à une prolifération cellulaire pouvant conduire à des désordres myéloprolifératifs (Zhao *et al*, 2008) (Figure 23).

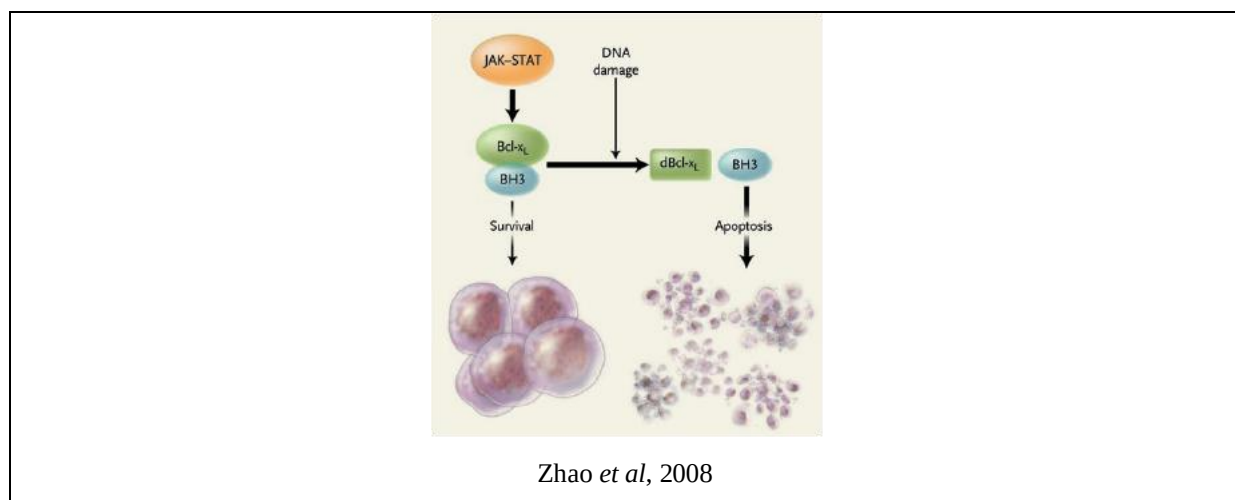


Figure 23 : Désamidation de Bcl-X_L dans une cellule apoptotique

L'activation de la voie JAK/STAT, suite à un dommage de l'ADN, entraîne la désamidation de Bcl-X_L qui perd alors sa capacité à séquestrer les protéines BH3-seulement. Ces dernières sont alors libres d'induire l'apoptose.

Dans les hépatocytes, Bcl-X_L est désamidée au niveau des Asn 52 et Asn 66 (Takehara et Takahashi, 2003). Elle est associée à une perte de sa fonction anti-apoptotique (Deverman *et al*, 2002). La voie JNK est une voie primordiale dans l'activation de l'apoptose. Suite à un stress, l'activation de JNK augmente le relargage de cytochrome c à la fois par inactivation de Bcl-X_L désamidée et par translocation de Bax à la mitochondrie. La désamidation de Bcl-X_L est peut être induite pour transloquer Bax à la mitochondrie (Asakura *et al*, 2008).

3.1.3- Bcl-2

Bcl-2 et phosphorylation

Les premières expériences avaient montré que la phosphorylation de la Ser 70 de Bcl-2 par PKC était requise pour sa fonction anti-apoptotique, généralisant alors l'idée que la phosphorylation de Bcl-2 augmentait la survie cellulaire des cellules privées en IL-3 (Ito *et al*, 1997 ; May, 1997). De plus, la phosphorylation de Bcl-2 par PKC α augmente non seulement sa fonction anti-apoptotique mais également la résistance aux agents chimiothérapeutiques dans des cellules de leucémies humaines (Ruvolo *et al*, 1998).

La phosphorylation de Bcl-2 est néanmoins très controversée : même si la plupart des papiers supportent l'idée originale que, de manière générale, sa phosphorylation inhibe sa fonction anti-apoptotique, plusieurs papiers tendent à prouver le contraire. En effet, dans les cellules traitées avec des agents anti-mitotiques (taxane, vincristine, acide rétinoïque, paclitaxel), la phosphorylation de Bcl-2 est associée à la mort cellulaire. Notamment le Paclitaxel inhibe la fonction anti-apoptotique de Bcl-2 en induisant la phosphorylation des résidus Thr 69, Ser 70 et Ser 87 par les MAPK, ce qui augmente la susceptibilité des cellules à entrer en apoptose (Ruvolo *et al*, 2001). Ces résultats sont confirmés par Bassik et collaborateurs (Bassik *et al*, 2004). Bcl-2 possède plusieurs domiciliations cellulaires : membrane externe mitochondriale, réticulum endoplasmique et enveloppe nucléaire (Akao *et al*, 1994). Etant donné que dans les cellules de Jurkat, Bcl-2 phosphorylée est localisée en majeure partie dans le réticulum endoplasmique (RE) et que le calcium est un élément clé dans le déclenchement de l'apoptose, Bassik et collaborateurs se sont alors demandé si la phosphorylation de Bcl-2 influençait l'apoptose en affectant la régulation calcique du RE. Bcl-2 mutée au niveau des sites T69, S70 et S87 en alanine, soit une forme non phosphorylable de Bcl-2, montre une augmentation de la protection contre une mort dépendante du calcium, induite par le taxol. Bcl-2 non phosphorylée augmente la fuite de $[Ca^{2+}]_{RE}$ vers le cytoplasme et par conséquent diminue la $[Ca^{2+}]_{RE}$. Cette forme diminue également la $[Ca^{2+}]$ récupérée par les mitochondries. La phosphorylation de Bcl-2 inhibe sa fonction anti-apoptotique en altérant la dynamique du calcium du RE (Bassik *et al*, 2004).

Un des rôles principaux de Bcl-2 dans la prévention de l'apoptose est de se lier et de séquestrer les protéines BH3-seulement telles que Bim, Bid et Bad (Cheng *et al*, 2001). La forme non phosphorylée de Bcl-2 interagit mieux avec Bim, Bid et Bad comparé à la forme

sauvage. La phosphorylation de Bcl-2 dans le RE diminue son affinité avec les protéines BH3-seulement. La phosphorylation de Bcl-2 semble être suffisante pour induire un changement de conformation qui inhibe sa fonction anti-apoptotique (Bassik *et al*, 2004).

La phosphorylation de Bcl-2 diminue son interaction avec Bax dans des cellules traitées à l'IL-3, libérant Bax du complexe Bcl-2/Bax, induisant ainsi l'apoptose (Halder *et al*, 1996 ; Poommipanit *et al*, 1999). De même, l'induction de l'apoptose par le NO dans des cellules neuronales entraîne l'activation de p38MAPK et ERK, et la phosphorylation de la sérine 70 de Bcl-2. Cette phosphorylation transloque Bax à la mitochondrie, déclenchant ainsi le processus apoptotique (Ishikawa *et al*, 2003).

Bcl-2 et phosphorylation/ubiquitinylation

Dans les cellules endothéliales, TNF- α induit la déphosphorylation, l'ubiquitinylation et la dégradation de Bcl-2 pour finalement conduire à l'apoptose (Dimmeler *et al*, 1999). La phosphorylation de Bcl-2 sur les sites consensus de MAP Kinases, T56 T74 et S87, influe sur sa stabilité. En effet une inactivation de ces sites conduit à une ubiquitinylation de Bcl-2 et à sa dégradation par le protéasome 26S. (Breitkopf *et al*, 2000). Johnson et Boise ont également montré que Bcl-2 était incapable d'inhiber la mort induite par TNF- α dans la lignée cellulaire pro-B (FL5.12) murine (Johnson et Boise, 1999).

3.2- Les membres pro-apoptotiques à multi-domaines BH de type Bax/Bak

La mort induite par la surexpression de protéines BH3-seulement semble être bloquée quand les gènes Bax et Bak sont éteints (Lindsten *et al*, 2000). Bax et Bak sont donc des éléments indispensables de la voie apoptotique mitochondriale, et sont activées en aval de l'activation des protéines BH3-seulement. Suite à leur activation, elles perméabilisent la membrane externe mitochondriale, de par la formation de pores, autorisant ainsi le relargage de protéines apoptotiques dans le cytosol. Leurs activations et inactivations s'effectuent par interactions avec des protéines pro-apoptotiques dites activatrices et par des protéines anti-apoptotiques. Malgré l'importance capitale de Bax et Bak, leur mécanisme de régulation est très peu connu. Bak est une protéine de la membrane externe mitochondriale alors que Bax est cytosolique sous sa forme inactive (Wolter *et al*, 1997). L'extrémité C-terminale de Bax, contenant son domaine transmembranaire, serait enfouie dans sa poche hydrophobe et nécessiterait alors une étape d'activation supplémentaire par rapport à Bak, lui permettant d'être transloquée aux mitochondries (Giam *et al*, 2008). Cette activation supplémentaire serait régulée par des modifications post-traductionnelles et explique peut-être le fait que peu de littérature n'ait été décrite concernant les modifications post-traductionnelles de Bak.

Bax et phosphorylation

La phosphorylation de la sérine 184 de Bax régule son activité et nécessite l'activation de PI3K/Akt. Dans les neutrophiles, sous sa forme phosphorylée sur la sérine 184, Bax est cytosolique, hétérodimerisée avec Mcl-1, Bcl-X_L et A1 (Gardai *et al*, 2004). Dans les neutrophiles apoptotiques, la forme phosphorylée diminue au profit de la forme non-phosphorylée sur la sérine 184 et Bax est alors relocalisée au sein des mitochondries. La sérine 184 de Bax peut également être phosphorylée par PKC ξ (Xin *et al*, 2007). Le traitement des cellules à la nicotine induit une augmentation de l'activité de PKC ξ , une phosphorylation de Bax et un prolongement de la survie cellulaire, effets qui peuvent être supprimés par l'utilisation d'un inhibiteur de PKC ξ (Xin *et al*, 2007). Il a aussi été montré que la phosphatase 2A, non seulement déphosphoryle Bax mais aussi active ses fonctions pro-apoptotiques (Xin et Deng, 2006). La phosphorylation de la sérine 184 inhibe donc les effets de Bax sur les mitochondries en la maintenant inactive dans le cytoplasme. Ceci dit, la manière dont Bax est dirigée vers les mitochondries n'est pas clairement identifiée. La phosphorylation de Bax sur la thréonine 167 par JNK et/ou p38MAPK dans des hépatocytes humains stimulés par la staurosporine ou H₂O₂, pourrait jouer un rôle dans la translocation de la protéine aux mitochondries (Kim *et al*, 2006). Selon Kim et collaborateurs, la phosphorylation de la thréonine 167 pourrait induire un changement de conformation de Bax, exposant ainsi ses extrémités N-terminale et C-terminale contenant respectivement le domaine actif et le domaine transmembranaire (Kim *et al*, 2006). La libération de ces extrémités induit alors la translocation de Bax aux mitochondries (Figure 24). Par la suite, il a pu être montré que p38MAPK n'agit pas sur la relocalisation de Bax mais sur son activation dans les mitochondries (Owens *et al*, 2009).

Généralités – Régulation des protéines apoptotiques de la famille Bcl-2 Par modifications post-traductionnelles

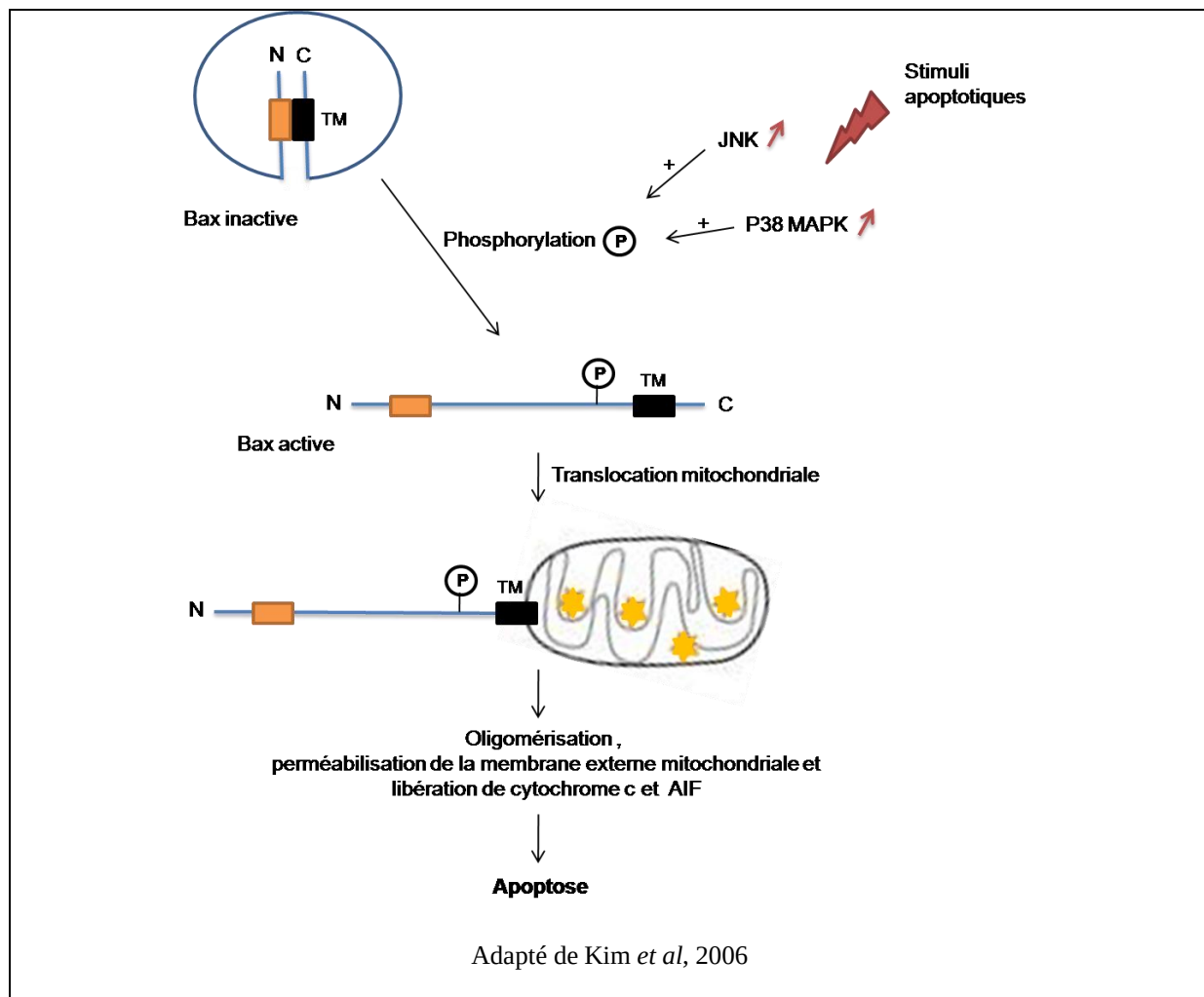


Figure 24 : Modèle de régulation de Bax induite par sa phosphorylation par JNK et p38 MAPK

A l'état physiologique, Bax est maintenue inactive dans le cytosol. L'induction d'un stimulus apoptotique active certaines kinases dont JNK et p38MAPK, ce qui entraîne la phosphorylation de Bax. Bax change alors de conformation et libère ses extrémités N-terminale, contenant son domaine actif, et C-terminale, contenant son domaine transmembranaire. La protéine peut ainsi être relocalisée au sein des mitochondries et initier la voie apoptotique intrinsèque mitochondriale.

Une phosphorylation de la sérine 163 par la GSK3 β augmente également l'effet pro-apoptotique de Bax (Linseman *et al*, 2004).

Bax et ubiquitinylation

L'inhibition du protéasome dans des cellules sur-exprimant Bcl-2, provoque l'accumulation de Bax dans les mitochondries et le cytoplasme, où elle interagit avec Bcl-2 (Li et Dou, 2000). Dans un premier temps, l'accumulation de Bax dans le cytoplasme serait neutralisée par la surexpression de Bcl-2, puis, l'accumulation de Bax dans les mitochondries pourrait alors induire la perméabilisation de celles-ci. Dans des tissus provenant d'échantillons de cancer agressif de la prostate, la diminution de l'expression de Bax est liée à sa dégradation (Li et Dou, 2000). Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) induisent l'apoptose en régulant la phosphorylation et l'ubiquitinylation des protéines Bcl-2 dont Bax

3.3- Les membres pro-apoptotiques à domaine BH3-seulement

Les membres pro-apoptotiques BH3-seulement sont des tueurs latents qui attendent d'être activés dans la cellule en réponse à un stimulus apoptotique. Cette activation passe par des modifications post-traductionnelles qui régulent leur activité.

3.3.1- Bid

Bid et clivage protéolytique

Bid est clivée après l'Asp 60 et l'Asp 75 par la caspase-8 pour générer une forme tronquée de Bid (tBid). tBid activée correspond au fragment C-terminal de la protéine. Elle active Bax au niveau des mitochondries et provoque ainsi le relargage de protéines mitochondriales inter-membranaires comme le cytochrome c. Cependant, Bid peut également être clivée par la caspase-3, activée après le relargage de cytochrome c. tBid amplifierait ainsi le processus apoptotique (Degli Esposti *et al*, 2003).

Bid et phosphorylation

La phosphorylation de Bid par des caséines kinases régule son clivage par la caspase-8 (Desagher *et al*, 2001). La phosphorylation de Thr 59 inhibe le clivage de Bid par la caspase-8.

Bid et N-Myristoylation

La localisation des protéines dans des compartiments cellulaires distincts est un événement critique dans la mort cellulaire. Suite à un signal, la redistribution des protéines modifie souvent leur activité. Bid est localisée dans le cytosol alors que tBid est transloquée à la mitochondrie, sans pour autant posséder de signal de localisation mitochondriale. La protéolyse de Bid par la caspase-8 expose une glycine à l'extrémité N-terminale du fragment p15 généré. Cette glycine (60) se situe dans un site potentiel de myristoylation (Johnson *et al*, 1994). Zha et collaborateurs ont alors montré dans des cellules Jurkat stimulées par Fas, que le fragment p15 pouvait être myristoylée, et non la protéine Bid entière (p22). Des expériences complémentaires couplant la GFP en C-terminal de Bid ou de Bid mutée sur son site potentiel de myristoylation (G60A) montrent que la forme mutée de Bid est incapable d'être relocalisée à la mitochondrie. La myristoylation permet donc à tBid d'interagir avec la membrane externe mitochondriale pour activer Bax et/ou Bak et d'induire la fuite de cytochrome c dans le cytosol (Zha *et al*, 2000).

Bid et Ubiquitinylation

tBid peut être ubiquitinylée sur 4 Lys potentielles. Des mutations de ces Lys en Arg stabilisent la protéine. De plus, l'utilisation d'un inhibiteur du protéasome MG-132 inhibe la

dégradation de tBid. La surexpression de cette forme stabilisée augmente le relargage de cytochrome c dans le cytosol et donc le processus apoptotique. De même, l'induction de la mort cellulaire par tBid est considérablement augmentée lorsque la dégradation de tBid est inhibée par MG-132 (Breitschopf *et al*, 2000). La forme active de Bid, soit tBid, est instable et peut être ubiquitinylée et dégradée par le protéasome 26S, alors que la forme inactive Bid est stable. Les deux formes de Bid possèdent les Lys impliquées dans cette stabilité protéique. Il doit donc y avoir un deuxième niveau de régulation de cette modification post-traductionnelle.

En l'absence de stimulation, la région N-terminale de Bid séquestre le domaine BH3. Bid est activée suite à un clivage protéolytique, qui délivre ce domaine BH3 (tBid-C ou p15). L'accessibilité du domaine BH3 facilite ainsi la formation de complexes avec d'autres membres apoptotiques. Clohessy et collaborateurs ont montré une interaction possible entre tBid et Mcl-1, interaction qui empêche le relargage de cytochrome c dans le cytosol (Clohessy *et al*, 2006). Cette interaction pourrait, non seulement séquestrer tBid, mais également stimuler sa dégradation *via* le système ubiquitine-protéasome, tout comme Noxa et Mcl-1 (Willis *et al*, 2005). Il n'est pas non plus sans exclure qu'une phosphorylation de tBid puisse réguler sa dégradation comme c'est le cas pour beaucoup de protéines de la famille de Bcl-2. Bim, par exemple, peut être phosphorylée sur les Ser 55, Ser 65 et Ser 73, ce qui augmente la réponse apoptotique par réduction de sa dégradation protéasomique (Hübner *et al*, 2008).

Le second fragment (tBid-N ou p7), formé suite au clivage par la caspase-8, est ubiquitinylé et dégradé par le protéasome. L'ubiquitinylation de tBid-N n'est pas conventionnelle puisqu'elle n'implique ni de Lys ni le NH₂ du premier acide aminé N-terminal. L'ubiquitine se fixe *via* une liaison thioester (Cys) ou une liaison hydroxyester (Ser ou Thr). De plus, cette dégradation est indispensable à l'activité pro-apoptotique de tBid-C. En effet une inhibition de la dégradation de tBid-N bloque la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale sans pour autant bloquer la translocation à la mitochondrie (Figure 26) (Tait *et al*, 2007).

Généralités – Régulation des protéines apoptotiques de la famille Bcl-2 Par modifications post-traductionnelles

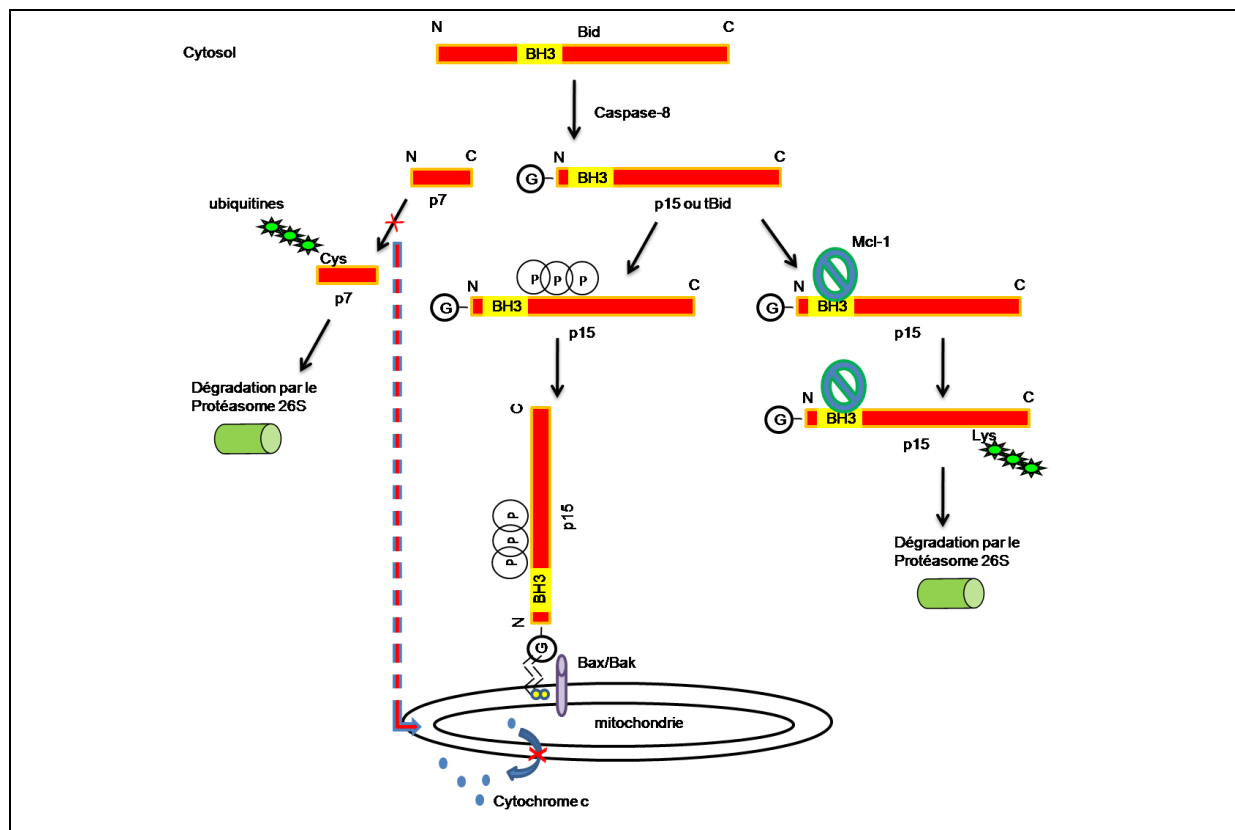


Figure 26 : Modèle de régulations post-traductionnelles de Bid

Une stimulation de la cellule par FAS induit l'activation de la caspase-8 et la protéolyse de Bid en 2 fragments p7 et p15 (tBid). P7 est ubiquitinylée sur un site non conventionnel au niveau d'une Cys puis dégradée par le protéasome 26S. Le clivage de Bid génère une Gly (G) libre à l'extrémité N-terminale de tBid. Cette Gly peut être myristoylée, conduisant ainsi à l'interaction de tBid avec la mitochondrie où elle pourra activer Bax/Bak et induire le relargage de cytochrome c. Il semblerait que cette myristoylation soit sous le contrôle de phosphorylations préalables de tBid. Si tBid n'est pas phosphorylée, Mcl-1 peut interagir avec son domaine BH3 et ainsi la séquestrer et faciliter sa dégradation par le protéasome 26S. Une inhibition de la dégradation du fragment p7 n'empêche pas le fragment p15 d'être transloqué à la membrane mais bloque la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale.

3.3.2- Bad

Bad et phosphorylation

L'étude des sites potentiels de phosphorylation de Bad a révélé trois résidus sérines (Ser) impliqués dans la régulation de son activité pro-apoptotique : Ser¹¹², Ser¹³⁶ et Ser¹⁵⁵ (Zha *et al*, 1996 ; Lizcano *et al*, 2000) (Figure 27). La sérine 155 réside dans le domaine BH3 de Bad, domaine qui permet d'interagir et neutraliser des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 tels que Bcl-2 et Bcl-X_L (Ottillie *et al*, 1997). Une mutation de cette Ser¹⁵⁵ en Asp ou Glu, imitant une phosphorylation de Bad, protège la cellule de l'apoptose suggérant ainsi que la phosphorylation de Bad sur la Ser¹⁵⁵ neutralise la fonction apoptotique de Bad (Tan *et al*, 2000).

Généralités – Régulation des protéines apoptotiques de la famille Bcl-2 Par modifications post-traductionnelles

Des mutations combinatoires de ces trois sérines ont mis en évidence que la phosphorylation de la Ser¹⁵⁵ requiert, au préalable, la phosphorylation des résidus Ser¹³⁶ et Ser¹¹² et que la Ser¹³⁶ est indépendante des deux autres (Datta *et al*, 2000).

Zha et collaborateur ont montré, que sous l'influence d'IL-3, Bad phosphorylée sur les Ser¹¹² et Ser¹³⁶ pouvait interagir avec la protéine 14-3-3 et non plus avec Bcl-X_L, favorisant la survie cellulaire (Zha *et al*, 1996). La phosphorylation de la Ser¹³⁶ serait le site dominant de fixation à la protéine 14-3-3 (Masters *et al*, 2001). L'interaction de 14-3-3 avec la Ser¹³⁶ phosphorylée de Bad pourrait alors induire un changement conformationnel autorisant l'accès de la Ser¹⁵⁵ pour une éventuelle phosphorylation. Cependant le complexe Bcl-X_L/Bad/14-3-3 n'a jamais été mis en évidence (Datta *et al*, 2000). A l'inverse, quand Bad est séquestrée dans le cytosol par la protéine 14-3-3, c'est la phosphoSer¹¹² qui doit être déphosphorylée en premier par la phosphatase PP2A pour induire la déphosphorylation de la phosphoSer¹³⁶ et de la phosphoSer¹⁵⁵ (Chiang *et al*, 2003).

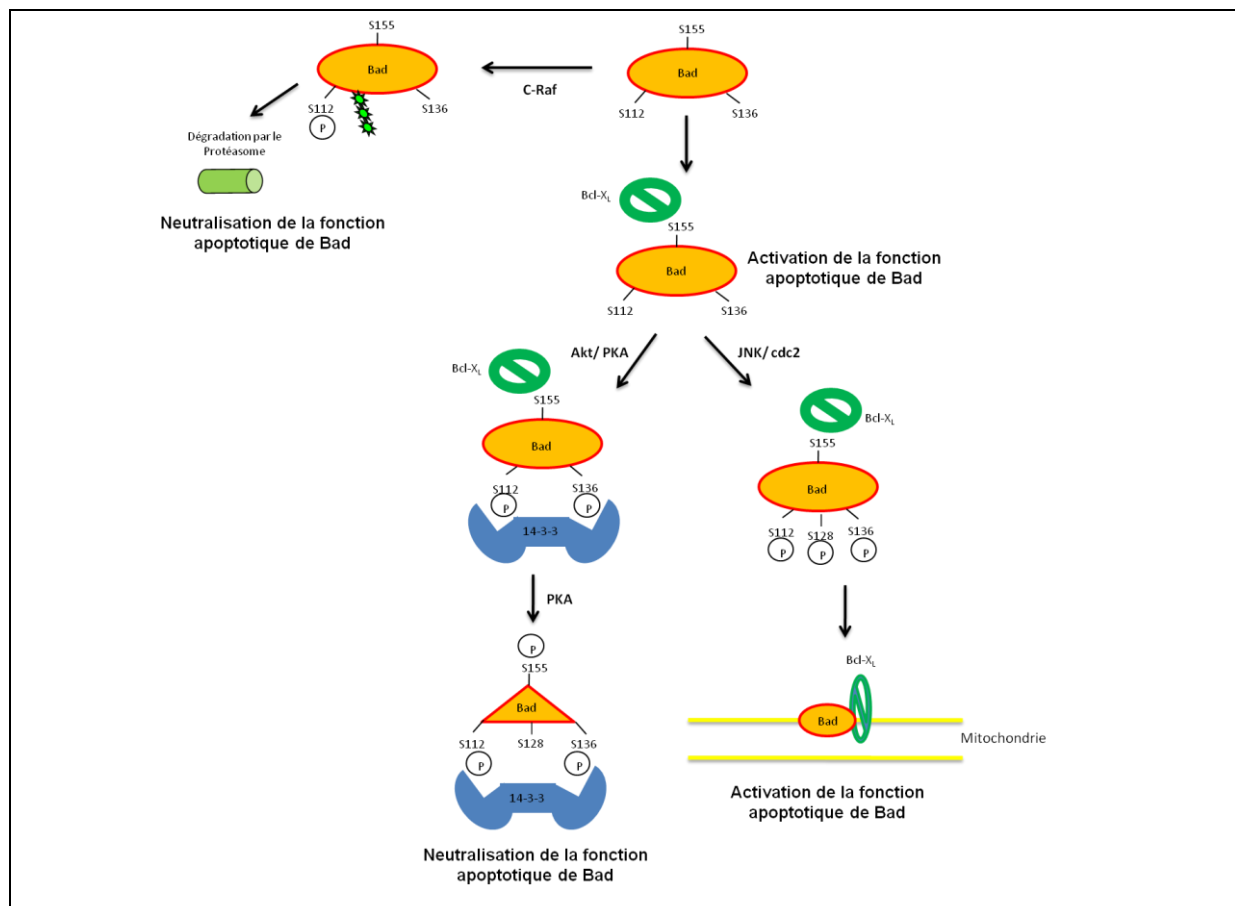


Figure 27 : Régulation post-traductionnelle de Bad

Bad possède plusieurs sites de phosphorylation. Bad sera donc régulée en fonction des kinases activées. La phosphorylation de la Ser¹¹² par C-Raf provoque sa dégradation *via* le système ubiquitine-protéasome. Bad peut, au niveau de la sérine 155, interagir avec les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 telles Bcl-X_L et Bcl-2. La phosphorylation des Ser¹¹² (Akt) et Ser¹³⁶ (PKA) permet de recruter 14-3-3 et d'être séquestrée sous une forme inactive dans le cytosol. Le recrutement de 14-3-3 permettrait une modification conformationnelle de Bad, permettant ainsi la phosphorylation possible de la Ser¹⁵⁵. La Ser¹⁵⁵ phosphorylée empêcherait l'interaction avec la poche hydrophobe de Bcl-X_L. Une phosphorylation de la Ser¹²⁸ par cdc2 ou JNK empêche le recrutement de la protéine 14-3-3 et favorise l'interaction de Bcl-X_L et Bad dans la membrane externe mitochondriale.

Généralités – Régulation des protéines apoptotiques de la famille Bcl-2 Par modifications post-traductionnelles

La phosphorylation de Bad n'est pas uniquement impliquée dans son interaction avec des membres anti-apoptotiques de Bcl-2 : elle influence également sa localisation intracellulaire. Une privation en IL-7 conduit à une déphosphorylation de Bad qui est alors transloquée à la mitochondrie où elle s'associe avec les membres anti-apoptotiques et induit la mort des cellules T (Li *et al*, 2004b). Cependant la régulation de la localisation semble plus complexe dans la mesure où, dans des cellules saines, Bad peut résider au niveau des mitochondries sous une forme phosphorylée. Dans ce cas, la localisation de Bad pourrait réguler ses fonctions mitochondriales autres qu'apoptotiques (Danial *et al*, 2003).

La phosphorylation de Bad est sous le contrôle de plusieurs protéines kinases. Ainsi un même site de phosphorylation peut être impliqué dans différentes voies de signalisation (Tableau 2).

Tableau 2 : Un même site pour différentes kinases : multiples voies de régulations possibles pour Bad (protéine murine)

Sites de phosphorylation	Kinases impliquées	Références
Ser ¹¹²	PKA, p90RSK, Pim-1, Pim-2, PAK1, PAK5, ERK1/2	Datta <i>et al</i> , 2002; Tan <i>et al</i> , 1999, Aho <i>et al</i> , 2004; Yan <i>et al</i> , 2003; Schürmann <i>et al</i> , 2000; Cotteret <i>et al</i> , 2003; Jin <i>et al</i> , 2004
Ser ¹³⁶	Akt, p70S6K, PAK1	Datta <i>et al</i> , 2002 ; Harada <i>et al</i> , 2004 ; Schürmann <i>et al</i> , 2000
Ser ¹⁵⁵	PKA, RSK	Virdee <i>et al</i> , 2000 ; Tan <i>et al</i> , 2000 ; Zhou <i>et al</i> , 2000
Thr ²⁰¹	JNK	Yu <i>et al</i> , 2004
Thr ¹¹⁷	CKII	Klumpp <i>et al</i> , 2004
Ser ¹²⁸	JNK, Cdc2	Donovan <i>et al</i> , 2002 ; Konishi <i>et al</i> , 2002

Récemment, plusieurs nouveaux sites de phosphorylations ont été mis en évidence dans la protéine Bad humaine. La plupart se trouvent dans une région de 75 acides aminés comprenant le domaine BH3. En revanche, aucun site de phosphorylation ne se situe dans les 20 derniers acides aminés C-terminaux. La phosphorylation de la Ser¹²⁴ de la protéine Bad humaine semble impliquée dans l'interaction de Bad avec des lipides. Ce site de phosphorylation se situe à côté du motif FKK nécessaire pour l'interaction de Bad avec des lipides. La formation de ces pores est un processus réversible régulée par la phosphorylation de la Ser¹²⁴ et l'interaction de Bad avec 14-3-3. La présence de cette dernière perturbe la formation de pore (Polzien *et al*, 2009). Bad est une protéine associée à la membrane, qui possède davantage de caractéristiques d'un récepteur plutôt qu'un ligand, et qui navigue entre la mitochondrie et les différentes membranes selon un processus dépendant de la phosphorylation et de 14-3-3 (Hekman *et al*, 2006).

Bad et ubiquitinylation

Fueller et collaborateurs ont montré que la phosphorylation de la Ser¹¹² de la protéine Bad murine (Ser⁷⁵ de la protéine Bad humaine) par c-RAF induit sa poly-ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome (Figure 27). Bad possède 2 régions PEST, dont l'une chevauche le domaine de liaison à la protéine 14-3-3, ce qui implique que la fixation de 14-3-3 est en compétition avec sa dégradation (Fueller *et al*, 2008).

Bad et interactions avec des lipides

Le domaine C-terminal de Bad contient 2 motifs de liaison à des lipides qui lui permettent d'interagir principalement avec les charges négatives des phospholipides dont les cardiolipines de la mitochondrie. Cette interaction ne serait pas dépendante du statut phosphorylé ou non de Bad et ne nécessiterait pas l'intervention d'autres protéines. De plus, des cellules exprimant des mutants de Bad ne pouvant plus interagir avec les mitochondries par le biais de ces motifs sont résistantes à l'apoptose. Ces motifs sont donc nécessaires à l'activité pro-apoptotique de Bad (Hekman *et al*, 2006). L'association aux cardiolipines pourrait permettre à Bad de recruter ses partenaires anti-apoptotiques. Dans les cellules saines, l'extrémité C-terminale de Bcl-X_L est incapable de s'insérer dans la membrane mitochondriale à cause de son homodimérisation (Jeong *et al*, 2004). Hekman et collaborateurs ont montré que Bad mutée sur ces motifs de liaison aux lipides est capable d'interagir avec Bcl-X_L mais empêche la translocation mitochondriale de Bcl-X_L (Hekman *et al*, 2006). Suite à un stimulus apoptotique, Bad se libère de la protéine 14-3-3 et s'associe avec Bcl-X_L, libérant ainsi son extrémité C-terminale. Bad peut alors interagir avec la membrane mitochondriale et ainsi faciliter l'insertion de Bcl-X_L (Figure 27).

Bad et clivage protéolytique

Une privation en facteur de croissance ou un engagement des récepteurs de mort conduisent Bad à être clivée par des protéases type caspases ou granzyme B. Tout comme Bid, Bad clivée pourrait amplifier le processus apoptotique (Condorelli *et al*, 2001).

4- Conclusion : Importance de la connaissance d'une régulation par modifications post-traductionnelles en thérapeutiques

Des défauts dans les voies de mort cellulaire programmée (surexpression de Bcl-2, Mcl-1, Bcl-X_L) peuvent conduire à la survie d'une cellule cancéreuse mais peut également conférer des résistances aux traitements chimiothérapeutiques (Tse *et al*, 2008 ; Brotin *et al*, 2010). Les traitements anticancéreux peuvent initier l'apoptose *via* la voie intrinsèque mitochondriale. Actuellement des molécules visant les membres anti-apoptotiques sont en essais cliniques ou précliniques. Le premier agent entré en essai clinique et ciblant Bcl-2 est l'oblimersen sodium, un oligodéoxynucléotide antisens de Bcl-2. Les patients atteints de leucémie lymphoïde chronique traités par cet agent combiné avec d'autres traitements chimiothérapeutiques conventionnels ont vu leur durée de vie augmentée (Rai *et al*, 2008). Aujourd'hui, la recherche s'oriente sur des petites molécules capables d'inhiber directement les protéines anti-apoptotiques. Elles sont conçues pour lier le sillon hydrophobe constitué par les domaines BH1 à BH3 des protéines anti-apoptotiques, rentrant ainsi en compétition avec les protéines pro-apoptotiques. Ces molécules pourraient à la fois bloquer les protéines anti-apoptotiques, laissant les protéines pro-apoptotiques libres de déclencher la mort des cellules mais elles pourraient également agir avec leur domaine BH3 directement en activant Bax et Bak pour accentuer le phénomène apoptotique (Kang et Reynolds, 2009). Il n'y a pas un modèle typique de régulation de la mort cellulaire programmée. Même s'il existe certaines ressemblances entre les protéines apoptotiques, elles possèdent toutes leurs propres régulations. L'exemple de la régulation post-traductionnelle de certaines protéines apoptotiques de la famille Bcl-2 souligne la complexité des processus cellulaires à prendre en compte lors de l'élaboration de molécules à visée thérapeutique. L'affinité qu'aura une molécule thérapeutique vis-à-vis d'une protéine apoptotique ne dépend pas que de sa structure tertiaire. Il est indispensable de connaître, au mieux, et de prévenir les modifications post-traductionnelles susceptibles d'intervenir dans ces affinités pour limiter l'instabilité protéique de composés thérapeutiques (Wakankar et Borchardt, 2006).

Introduction : Galig et les galigines

I- Galig ou la complexité génique

Loin du concept “1 gène, 1 ARNm, 1 protéine”, il est maintenant admis que la complexité génique tient une place importante dans la régulation cellulaire des eucaryotes. Le locus du gène de la galectine-3 humaine en est un bon exemple. Lors du clonage des séquences promotrices de la galectine-3, un nouveau promoteur interne localisé dans l'intron 2 du gène a été mis en évidence (Raimond *et al*, 1995) (Figure 28). La complexité s'accroît avec la possibilité de transcrire un ARNm qui présente 3 cadres de lecture ouverts différents et chevauchants permettant la traduction de 2 nouvelles protéines distinctes de la galectine-3. Cette structure génique complexe a été dénommée « **galig** » pour **galectin-3 internal gene** (Guittaut *et al*, 2001), et les protéines issues de l'expression de galig dans des cellules en culture, les galigines. Ces protéines présentent des localisations cellulaires différentes à l'origine de leur appellation : la mitogaligine a été initialement associée aux mitochondries, et la cytogaligine, au cytosol (Guittaut *et al*, 2001). Cependant, des travaux plus récents indiquent que la mitogaligine peut être en partie associée au noyau (Gonzalez *et al*, 2009), et la cytogaligine aux mitochondries.

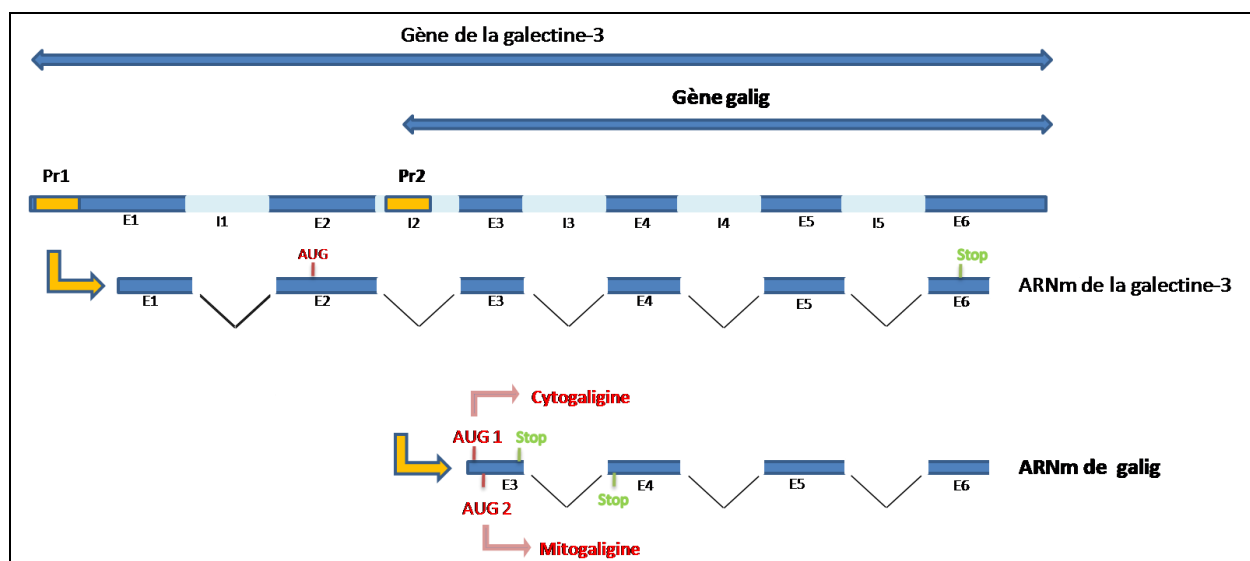


Figure 28 : Galig, un gène interne au gène de la galectine-3

Le gène de la galectine-3 possède 6 exons représentés par les rectangles bleu foncé nommés E1 à E6 et 5 introns, représentés par des rectangles bleu clair nommés I1 à I5. Le promoteur du gène galig, ou Pr2, est localisé dans le second intron du gène de la galectine-3 (rectangle orange). A partir de ce promoteur est initiée la transcription de l'ARNm de galig (E3 à E6). Ce transcrit possède ses propres cadres de lecture : l'un initié au niveau de l'AUG 1 qui traduit la cytogaligine, et un autre, chevauchant, au niveau du site de traduction AUG 2 qui code pour la mitogaligine.

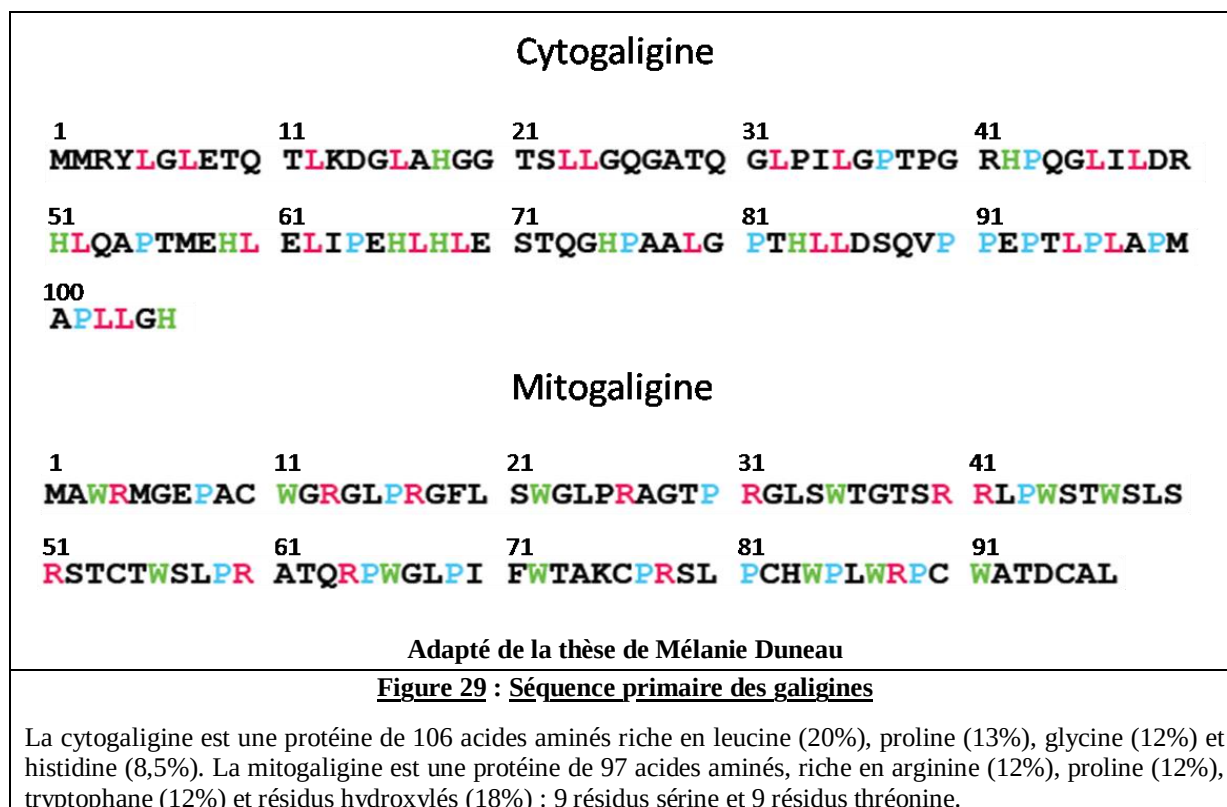
Galig = Galectin-3 internal gene

Les cellules transfectées par le gène *galig* rendent compte d'altérations morphologiques caractéristiques d'une mort cellulaire programmée. Les cellules sont petites, rondes, avec des organites intracellulaires condensés et agrégés. Le noyau présente une condensation de la chromatine (Duneau *et al*, 2005).

II- Les galigines et la mort cellulaire programmée

1- Structure

Les galigines sont codées par l'exon 3 du gène de la galectine-3, selon un cadre de lecture alternatif de la galectine-3 (Figure 28). Cet exon est essentiellement composé d'une séquence d'ADN répétitive de 204 paires de bases (Cherayil *et al*, 1990 ; Oda *et al*, 1991 ; Raz *et al*, 1991). Ces protéines possèdent donc des séquences totalement distinctes et de nature répétée (Figure 29).



L'exon 3 code pour un domaine spécifique de la galectine-3 humaine et n'est retrouvé chez aucun autre membre de la famille des galectines (Barondes *et al*, 1994). L'alignement de ce domaine avec le domaine correspondant de la galectine-3 d'autres espèces a mis en évidence 68 % d'identité chez le lapin, 73 % chez le chien, 80 % chez le hamster et 71 % chez la souris. L'alignement de la mitogaligine humaine avec d'autres mitogaligines putatives montre également un pourcentage d'homologie significatif chez ces mêmes espèces (53 % chez le lapin, 50 % chez le chien, 62 % chez le hamster et 75 % chez la souris). La mitogaligine putative murine est plus particulière car sa taille est raccourcie (43 acides aminés) (Duneau *et al*, 2005). Il convient néanmoins de noter que la région la plus conservée concerne le domaine cytotoxique de la protéine (résidus 31 à 53 de la mitogaligine humaine).

La cytogaligine est une protéine relativement neutre à pH physiologique. La mitogaligine, de par sa richesse en arginine, possède quant à elle un caractère basique (point isoélectrique de 11,6 à pH 7) (Tableau 3). Son taux élevé de tryptophane rend la protéine très hydrophobe. La présence d'autant de résidus tryptophane associée au caractère basique de la protéine, rappelle les propriétés antimicrobiennes de certains peptides, connus pour déstabiliser les membranes biologiques (Falla *et al*, 1996 ; Schibli *et al*, 1999).

Tableau 3 : Caractéristiques biochimiques des galigines

Protéines	Nombre d'acides aminés	Masse moléculaire (Da)	Point isoélectrique à pH 7	Charges
Cytogaligine	106	11 253	6,6	3 charges négatives
Mitogaligine	97	11 168	11,6	11 charges positives

Les galigines ne possèdent aucune homologie de séquence avec les protéines déjà existantes dans les bases de données. Il est donc difficile de prédire leur structure et leur fonction au sein de la cellule. Néanmoins, la transfection de *galig* dans des cellules transfectées induit la mort cellulaire, ce qui suggère que ces protéines exercent une fonction cytotoxique.

2- Fonction cytotoxique des galigines

La mitogaligine a été initialement localisée dans les mitochondries. Le signal de localisation mitochondriale se situe dans la partie centrale de la protéine, de l'acide aminé 31 à l'acide aminé 46 (Duneau *et al*, 2005). Ce premier résultat illustre l'originalité de cette protéine puisque les signaux d'adressage mitochondrial sont le plus généralement situés dans la partie N-terminale des protéines (Pfanner *et al*, 1997).

Une cellule HOS morphologiquement « normale » est allongée, avec de petites ramifications, un noyau en position centrale, et des mitochondries filiformes. L'expression de la mitogaligine dans ces cellules entraîne une altération profonde de leur morphologie. La cellule se rétracte, s'isole des cellules voisines et finit par mourir. Lors de ce processus de mort, la membrane plasmique n'est pas altérée. Il apparaît une nette condensation et agrégation des mitochondries (Figure 30 A). L'utilisation du mitotracker rouge, un marqueur mitochondrial fluorescent, a également permis de mettre en évidence l'altération des mitochondries dans des cellules exprimant la mitogaligine-EGFP (Figure 30 B, Duneau *et al*, 2005). Que ce soit dans des cellules HeLa ou dans des cellules MCF-7 transfectées par un plasmide codant l'EGFP, la fluorescence présente une distribution diffuse dans les cellules (Colonne EGFP lignes N3). De plus ces cellules conservent une morphologie « normale » (Colonne MTR lignes N3). En revanche, dans les cellules HeLa exprimant la mitogaligine-EGFP, Duneau *et al*, mettent en évidence par le mitotracker rouge, une co-localisation avec la protéine de fusion ainsi qu'une condensation des mitochondries (Ligne MG HeLa). Les cellules MCF-7 exprimant la mitogaligine-EGFP ne sont pas marquées par le mitotracker rouge, suggérant ainsi une altération des mitochondries dans ces cellules (Ligne MG MCF-7).

Cette toxicité est très fortement atténuée lorsque les cellules sont transfectées par un vecteur qui ne code que pour la mitogaligine ou que pour la cytogaligine (Guittaut, thèse 2001 et Duneau, thèse 2005). Peu d'études ont été dirigées vers la cytogaligine. La fonction de cette protéine reste donc inconnue dans la mort cellulaire induite par galig.

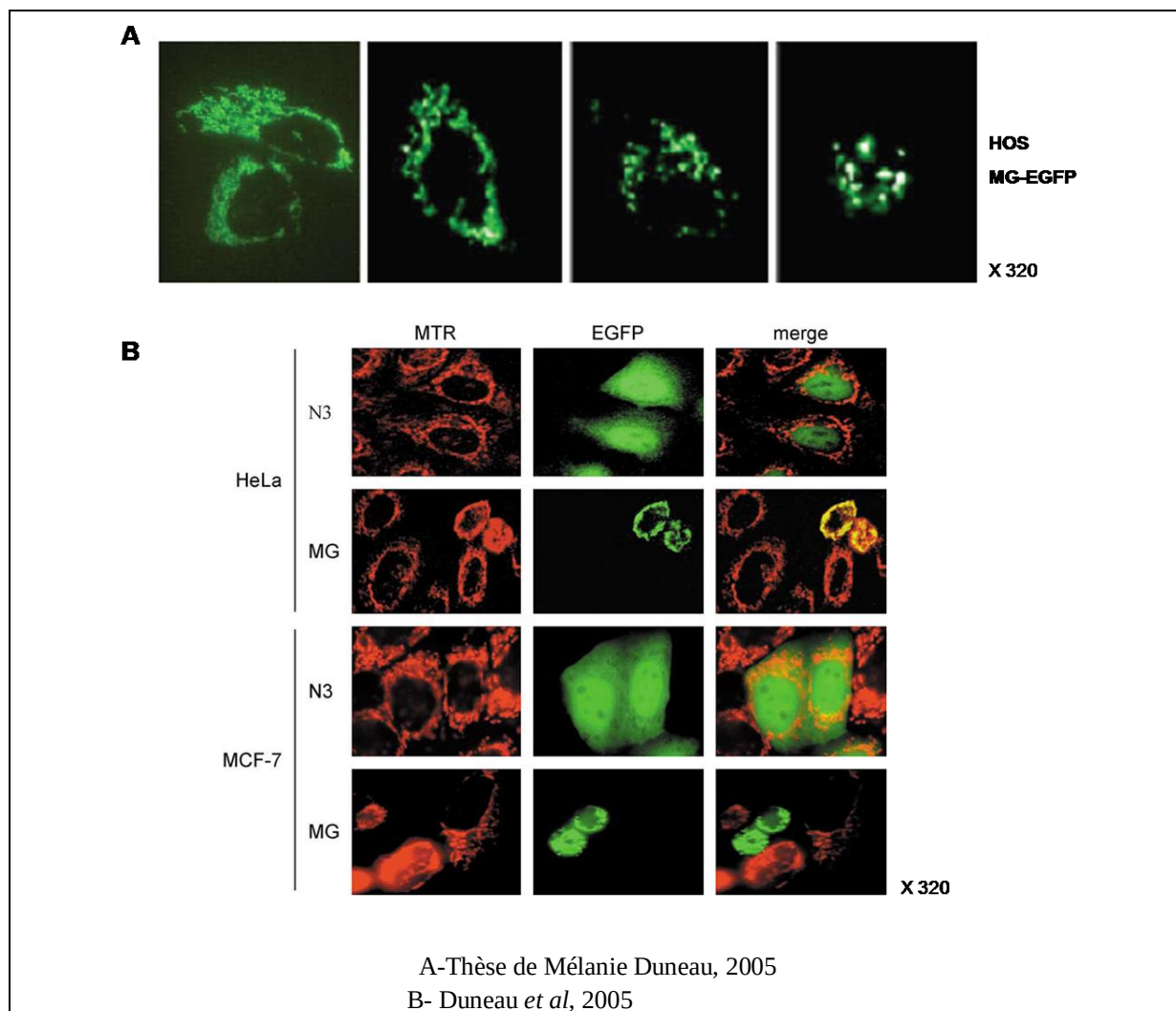


Figure 30 : La transfection de l'ADNc de galig dans des cellules en culture induit une condensation des mitochondries et la mort cellulaire

A- Cellules HOS transfectées par pMG-EGFP, codant pour la mitogaligine fusionnée en C-terminale à l'EGFP et la cytogaligine. Les cellules sont observées 24 à 48 h après transfection par microscopie de fluorescence. Grossissement $\times 320$

B- Cellules HeLa et MCF-7 transfectées par pN3 codant l'EGFP (Ligne N3) et pMG-EGFP codant la protéine de fusion mitogaligine-EGFP (ligne MG). Vingt-quatre heures après transfection, les cellules sont incubées avec 50 nM de Mito Tracker RED (MTR), puis analysées en microscopie de fluorescence (Grossissement $\times 320$) pour l'expression de l'EGFP (Colonne EGFP) et le marquage mitochondrial (Colonne MTR). Les photographies sont ensuite superposées pour mettre en évidence la co-localisation entre la mitogaligine-EGFP et le MTR (Colonne merge).

L'étude de la cytotoxicité des cellules en présence de différents peptides dérivés de la mitogaligine a montré que la séquence 31 à 54 de la protéine, qui comprend le signal d'adressage mitochondrial, était également responsable de son activité toxique. La

mitochondrie est donc au cœur de la toxicité induite par la mitogaligine. Ce résultat n'est pas surprenant puisque les mitochondries jouent un rôle essentiel au cours du processus apoptotique (Kroemer, 1998). Cette région de la mitogaligine est capable d'interagir avec des cardiolipines, phospholipides spécifiques des mitochondries et d'induire la fuite de cytochrome c. De plus, comme nous l'avons vu précédemment, la mitogaligine présente une homologie avec certains peptides antimicrobiens riches en résidus tryptophane, arginine et proline (Indolicidine, Triterpticine et dérivés lactoferricine) (Bellamy *et al*, 1992 ; Selsted *et al*, 1992 ; Lawyer *et al*, 1996). Elle est alors en mesure de déstabiliser les membranes mitochondriales et d'induire la fuite de cytochrome c (Gonzalez *et al*, 2007).

La mitogaligine possède donc des propriétés pro-apoptotiques. Cependant la mort cellulaire induite par cette protéine de fusion ne possède pas toutes les caractéristiques d'une mort par apoptose. En effet, même s'il y a libération de cytochrome c dans le cytosol, la caspase-3 reste inactive (Duneau, thèse 2005). De plus, la condensation de la chromatine ne s'accompagne pas d'une dégradation de l'ADN en fragments oligonucléosomiques typiques de l'apoptose. La mitogaligine mitochondriale pourrait alors induire la mort cellulaire par une voie alternative de la voie classique apoptotique.

Des études récentes au laboratoire indiquent que la mitochondrie n'est pas la seule domiciliation de cette protéine. Nous verrons, en première partie de résultats, que la mitogaligine peut également être adressée au noyau et induire la mort des cellules *via* une apoptose qui met en jeu l'activation de la caspase-3 et la dégradation internucléosomique de l'ADN. Ces travaux ont conduit à la rédaction de 2 articles (Gonzalez *et al*, 2009 ; Robinet *et al*, 2010).

3- Régulation de galig par des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2

La plupart, si ce n'est toutes les molécules apoptotiques de la famille Bcl-2, quelles soient pro ou anti-apoptotiques interagissent entre elles pour réguler la mort cellulaire. La mitogaligine induit la mort cellulaire *via* les mitochondries, tout comme les membres de la famille Bcl-2. La co-expression des galigines et de la protéine anti-apoptotique Bcl-X_L diminue la toxicité cellulaire (Duneau *et al*, 2005). Bcl-X_L agit en amont de la dépolarisation des membranes mitochondriales puisque sa surexpression réduit significativement la quantité de cytochrome c libéré dans le cytosol par la seule expression de galig. En revanche, un tel effet protecteur n'a pas été observé en présence d'une surexpression de Bcl-2. Galig pourrait donc intervenir dans l'une des voies apoptotiques des membres de la famille Bcl-2, entre autre Bcl-X_L.

III- Synopsis de ma thèse

Mon sujet de thèse a consisté à poursuivre les études portant sur la mitogaligine. Cette dernière est localisée majoritairement au sein des mitochondries. Cependant, nous verrons, au cours de la première partie de ce manuscrit, qu'il existe une localisation secondaire de la protéine. La mitogaligine peut, en effet, être adressée au noyau. Les cellules qui expriment la forme nucléaire de la protéine présentent des caractéristiques morphologiques d'une cellule en apoptose, supposant alors que la mitogaligine puisse également exercer une fonction cytotoxique au noyau. De plus, la forme associée aux mitochondries subit une protéolyse importante comparée à la forme nucléaire. Nous pouvons donc facilement comprendre l'intérêt d'étudier ces signaux d'adressage aux compartiments cellulaires dans la fonction de la protéine. La fonction cytotoxique associée à la localisation mitochondriale de la mitogaligine ayant déjà été déterminée au laboratoire, nous nous sommes intéressés à l'adressage nucléaire de la protéine et à caractériser les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la cytotoxicité de la mitogaligine nucléaire.

Beaucoup de protéines apoptotiques possèdent des doubles localisations qui régulent leur état d'activation ou la nature de leur fonction. Le transport vers l'une ou l'autre de ces domiciliations ainsi que l'activité des protéines sont souvent régulés par des modifications post-traductionnelles. La seconde partie de ma thèse s'est alors dirigée vers l'étude des modifications post-traductionnelles potentielles de la mitogaligine, qui pourraient réguler son trafic intracellulaire, son activité apoptotique et sa demi-vie. De part sa richesse en sites potentiels de phosphorylation, due à une haute teneur en thréonines, nous nous sommes en particulier intéressés à la phosphorylation. Nous verrons que la mutation phosphomimétique de certains résidus s'accompagne d'une diminution de la protéolyse de la mitogaligine mitochondriale et/ou d'une délocalisation des mitochondries.

L'activité des protéines peut également être régulée par interaction avec d'autres protéines. Généralement, dans la voie mitochondriale de l'apoptose les protéines pro-apoptotiques sont régulées par les membres anti-apoptotiques : leur interaction inhibe l'activité pro-apoptotique de la protéine. La réciproque est aussi vraie. Le troisième volet de ma thèse s'est focalisé sur les interactions possibles des galigines avec une protéine anti-apoptotique de la famille Bcl-2. Galig étant essentiellement exprimé dans les neutrophiles, et la protéine anti-apoptotique prédominante dans ces cellules étant Mcl-1 (Moulding *et al*, 1998), nous nous sommes alors demandé si ces protéines pouvaient être impliquées dans la même voie apoptotique et si elles pouvaient interagir ensemble. Les résultats obtenus permettent de dire que leur expression commune dans les leucocytes n'est pas une coïncidence : la surexpression de Mcl-1 protège la cellule de la mort induite par galig et la surexpression de galig diminue l'expression de Mcl-1 endogène.

Résultats

Partie I

Localisation nucléaire de la mitogaligine : De l'adressage à la fonction cytotoxique

Introduction

Bien que la mitochondrie soit la localisation majoritaire de la mitogaligine, le premier chapitre de cette partie montre que la protéine peut également être retrouvée dans le noyau. La mitogaligine est mise en évidence par l'utilisation d'une protéine reporteur : l'EGFP (Figure 31). Lorsque l'EGFP est placée à l'extrémité C-terminale de la mitogaligine, la protéine chimère est localisée au niveau des mitochondries. On constate néanmoins quelques cellules dont les noyaux sont positifs pour la protéine chimère. Ceci laisse supposer la présence d'un signal de localisation nucléaire en plus du signal de localisation mitochondriale. Nous avons révélé la présence de ce signal nucléaire en abrogeant le signal de localisation mitochondriale. Pour cela, nous avons tenu compte du fait que la position des séquences d'adressage mitochondrial au sein des protéines est critique pour l'activité du signal. En déplaçant l'EGFP de l'extrémité C-terminale de la mitogaligine à son extrémité N-terminale, la position relative du signal de localisation mitochondriale est ainsi modifiée (Mueller *et al*, 2004, Neupert et Herrmann, 2007). Dans ce cas, la mitogaligine n'est plus visualisée au sein des mitochondries mais au niveau du noyau.

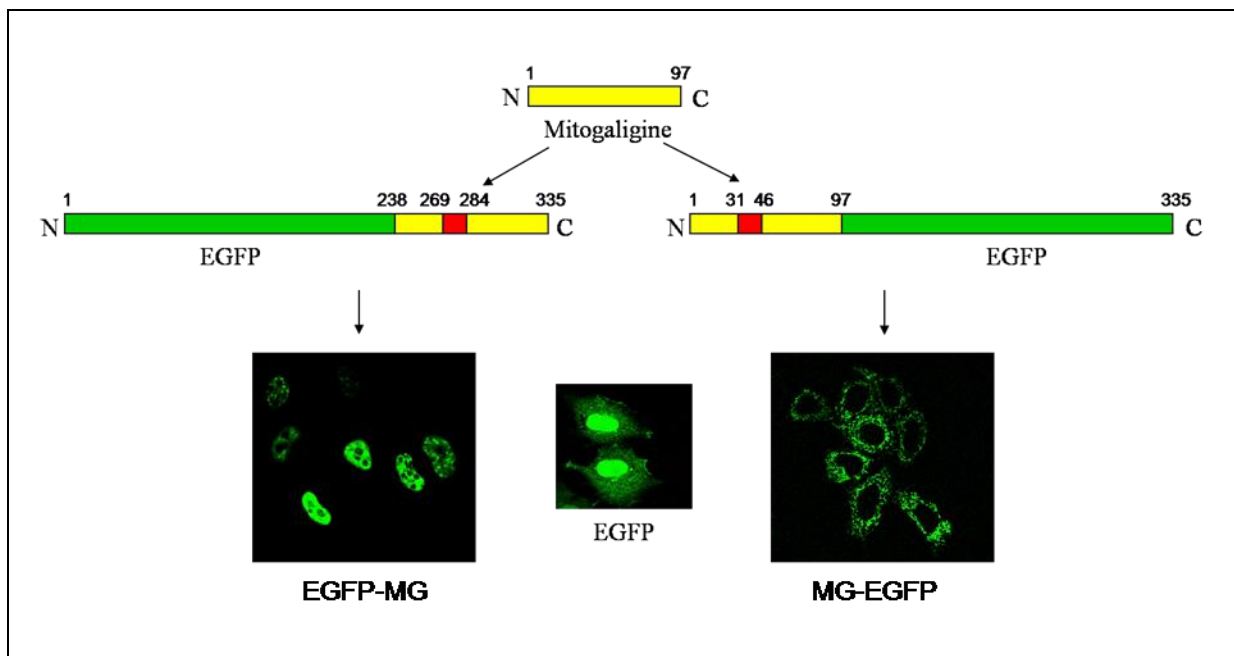


Figure 31 : Localisation nucléaire et mitochondriale de la mitogaligine

Schéma représentant la mitogaligine (rectangle jaune) et son signal de localisation mitochondrial situé entre les résidus 31 à 46 de la mitogaligine (rectangle rouge). La protéine est ensuite fusionnée à l'EGFP pour permettre sa détection dans des cellules HeLa. Les cellules sont transfectées par pEGFP, codant pour l'EGFP seule, pMG-EGFP codant pour la mitogaligine fusionnée à son extrémité C-terminale à la protéine de fluorescence verte EGFP, et pEGFP-MG, codant pour la mitogaligine fusionnée à son extrémité N-terminale à l'EGFP. Image obtenue par microscopie confocale $\times 320$.

L'EGFP possède une localisation diffuse dans la cellule (photo du milieu). MG-EGFP présente une localisation mitochondriale (photo droite).

L'expression de la mitogaligine dans les deux compartiments, mitochondries et noyau semble tenir une place importante dans la mort cellulaire. En effet, la mitogaligine mitochondriale et la mitogaligine nucléaire sont, toutes deux, capables d'induire des caractéristiques propres d'une mort cellulaire programmée. Il est donc d'un intérêt majeur d'étudier les signaux d'adressage de la mitogaligine, ceci constituera l'objet du second chapitre de cette partie.

Résultats

Chapitre 1 : Activité apoptotique de la mitogaligine nucléaire

Les travaux précédents de l'activité de galig montrent que son expression induit la mort cellulaire et que la mitogaligine tient une place importante dans cette cytotoxicité. Son interaction avec les cardiolipines entraîne la fuite de cytochrome c dans le cytoplasme. De plus, son action peut être contrecarrée par la surexpression de protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 telles que Bcl-X_L, confirmant ainsi son rôle apoptotique dans la voie mitochondriale (Duneau *et al*, 2005).

La plupart des cellules transfectées par un vecteur codant pour la mitogaligine-EGFP font apparaître une localisation mitochondriale de la protéine. Néanmoins, certaines d'entre elles présentent un noyau positif pour la protéine de fusion, suggérant alors une potentielle localisation nucléaire. Dans ce chapitre, il est montré que la mitochondrie n'est pas la seule domiciliation de la mitogaligine. Elle peut en effet être adressée au noyau lorsque son signal de localisation mitochondriale est aboli. Qu'elle soit nucléaire ou mitochondriale, la protéine conserve des propriétés cytotoxiques dans la cellule. La mitogaligine nucléaire est néanmoins plus toxique et induit l'apoptose *via* l'activation de la caspase-3 et selon des caractéristiques propres de l'apoptose tandis que la mitogaligine mitochondriale induit la mort de la cellule selon une voie alternative de la mort cellulaire programmée (Duneau, Thèse, 2005).

Ce travail a fait l'objet d'un article publié dans *Biochemical and Biophysical Research Communications* :

Gonzalez P, Robinet P, Charpentier S, Mollet L, Normand T, Dubois M, Legrand A. 2009. Apoptotic activity of a nuclear form of mitogaligin, a cell death protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **378**: 816-820.

Article

Biochemical and Biophysical Research Communications 378 (2009) 816–820



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc



Apoptotic activity of a nuclear form of mitogaligin, a cell death protein

Patrick Gonzalez, Pauline Robinet, Stéphane Charpentier, Lucile Mollet, Thierry Normand, Martine Dubois, Alain Legrand *

Centre de Biophysique Moléculaire, (affiliated with the University of Orléans) CNRS UPR4301, Rue Charles Sadron, 45071 Orléans Cedex 2, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 November 2008

Available online 9 December 2008

Keywords:

Programmed cell death

Apoptosis

Caspase activation

Dual cellular localization

ABSTRACT

Galig, an internal gene to the galectin-3 gene, encodes two proteins and induces cell death in human cells. Mitogaligin, one of these proteins, contains a mitochondrial targeting sequence and promotes the release of cytochrome c into the cytosol. Here, we show that mitogaligin can also localize to nucleus. The nuclear form of mitogaligin induced cell death through a pathway exhibiting typical properties of apoptosis. These observations indicate for the first time that mitogaligin expresses cytotoxic properties not only when addressed to mitochondria but also when targeted to the nucleus.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Apoptosis is a highly regulated cellular function essential for normal development and homeostasis. We have identified a new cell death inducer gene, *galig*, located within the human galectin-3 locus [1]. The gene contains two different overlapping open reading frames and encodes two unrelated proteins [2], each one distinct from Galectin-3. Mitogaligin, one of these proteins, is a 97 amino acid protein essentially targeted to mitochondria [2]. The mitochondrial addressing of mitogaligin relies on an internal sequence (residues 31–46), which is also required for the efficient cytosolic release of cytochrome c [1]. The process which destabilizes mitochondrial membrane is still unknown but involves a specific interaction of mitogaligin with cardiolipin, a characteristic phospholipid of mitochondria [3]. Although mitogaligin is not structurally related to proteins of the Bcl-2 family [4], it is antagonized by overexpression of Bcl-xL [1].

Meticulous observations of cells transfected with *galig* reveal that mitogaligin exhibits a dual localization in a small fraction of cells. In these cells, mitogaligin appears associated to the nucleus in addition to mitochondria. These observations suggest that, in addition to a predominant mitochondrial signal that we have previously characterized [1], mitogaligin could also be targeted to nucleus. To test this hypothesis, we have neutralized the mitochondrial targeting signal by fusing EGFP at the N-terminus of mitogaligin. Using this technical approach, mitogaligin almost exclusively localized in the nucleus. In addition, the targeting of mitogaligin to nucleus induced cell death with typical markers of apoptosis. These observations indicate that mitogali-

gin expresses cytotoxic properties not only when addressed to mitochondria but also when targeted to the nucleus.

Materials and methods

Expression vectors and cell transfections. The plasmid pMG-EGFP, encoding mitogaligin-EGFP, has been previously described [2]. pEGFP-MG, encoding EGFP fused to the N-terminus of mitogaligin (EGFP-mitogaligin), was constructed by insertion of the mitogaligin coding sequence in pEGFP-C1 (Invitrogen). HeLa cells (ATCC, CCL-2), cultured in E-MEM medium (Invitrogen) plus 10% fetal calf serum (Invitrogen), were transfected with plasmid DNA using DNA–polyethylenimine complexes [5], as described [2]. Confocal fluorescence microscopy (LSM510, Carl Zeiss S.A.S.) was performed 24 or 48 h after transfection, with fluorescein filters (excitation at 488 nm and detection at 520 nm for EGFP).

Cell death quantification. Cell death was evaluated by visible and epi-fluorescence microscopy. At least 200 transfected cells were taken into account from three independent experiments. When indicated, 10 μ M zVAD-fmk (Promega) was added immediately after transfection and 6 h later. Cells were further incubated with the inhibitor for 24 or 48 h. DNA damage was evaluated using TUNEL assay as described by the manufacturer (In Situ Cell Death Detection kit, Roche Diagnostics S.A.) and visualized under fluorescence microscopy (excitation at 568 nm and detection 600 nm).

Caspase-3 fluorogenic substrates. Forty-eight hours after transfection, caspase-3 activation was assayed using PhiPhilux®G₂D₂, as recommended by the manufacturer (OncoImmunin). Cells were analyzed by fluorescence microscopy (excitation at 552 nm and emission at 580 nm).

* Corresponding author. Fax: +33 2 38 25 78 07.

E-mail address: legrand@cnrs-orleans.fr (A. Legrand).

Partie I- Chapitre 1

Activité apoptotique de la mitogaligine nucléaire

P. Gonzalez et al./Biochemical and Biophysical Research Communications 378 (2009) 816–820

817

Cytochrome *c* and Bax immunofluorescence. Transfected cells, fixed in 4% paraformaldehyde and permeabilized with Triton X-100 0.1%, were incubated overnight at 4 °C with a 1/100 dilution of the 6H2.B4 anti-cytochrome *c* antibody (BD Biosciences) in 1% BSA-supplemented PBS or with anti-Bax 6A7, a mouse monoclonal conformation-specific antibody recognizing the activated mitochondrial form of Bax (Biosource, Invitrogen). Slides were then incubated with a 1/100 dilution of an anti-mouse Cy5 (Zymed) antibody. Cells were analyzed by fluorescence microscopy (excitation at 650 nm and emission at 670 nm).

Results

EGFP-tagged mitogaligin is targeted to the nucleus

As previously reported [1,2], transfection of a plasmid encoding mitogaligin-EGFP (pMG-EGFP) in HeLa cells confirmed the predominant mitochondrial localization of the fusion protein (Fig. 1). However, in few cells, mitogaligin-EGFP was also localized in the nucleus. Although these cells are rare, they are constantly found which suggests that mitogaligin might contain a second localization

signal. Transfection of pEGFP-MG, a plasmid with EGFP fused to the N terminus of mitogaligin, revealed that the protein was almost exclusively localized in the nucleus (Fig. 1) indicating that the mitochondrial addressing signal was invalidated. No diffuse fluorescence was detected in the cytosol.

The nuclear form of mitogaligin induces caspase-dependent cell death

HeLa cells expressing EGFP had the typical flat morphology of normal viable cells. Twenty-four hours after transfection, some cells transfected with the nuclear EGFP-mitogaligin appeared shrunk and began to detach from plastic. After 48 h, almost all transfected cells were dead (Fig. 2A). These results showed that the nuclear form of mitogaligin, as the mitochondrial form, can engage the cell in a process of cell death.

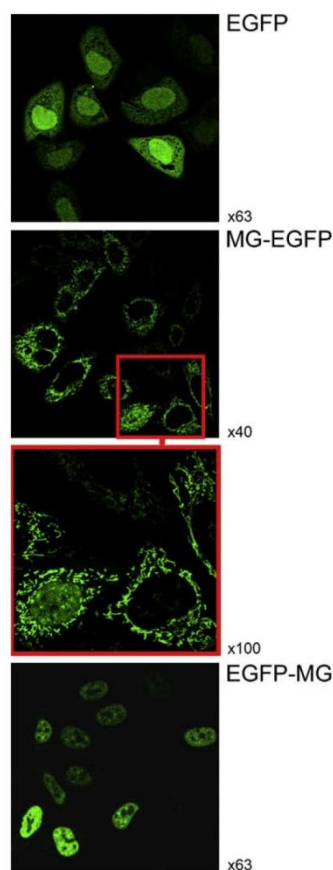


Fig. 1. EGFP-mitogaligin localized to mitochondria. HeLa cells were transfected with plasmids encoding EGFP, mitogaligin-EGFP (MG-EGFP), or EGFP-mitogaligin (EGFP-MG) and observed 24 h later under confocal fluorescence microscopy. The red square (MG-EGFP picture) points to an enlargement which shows that some pMG-EGFP transfected cells contain nuclear fluorescence. 630× magnification except third row 1000× magnification. (For interpretation of color mentioned in this figure the reader is referred to the web version of the article.)

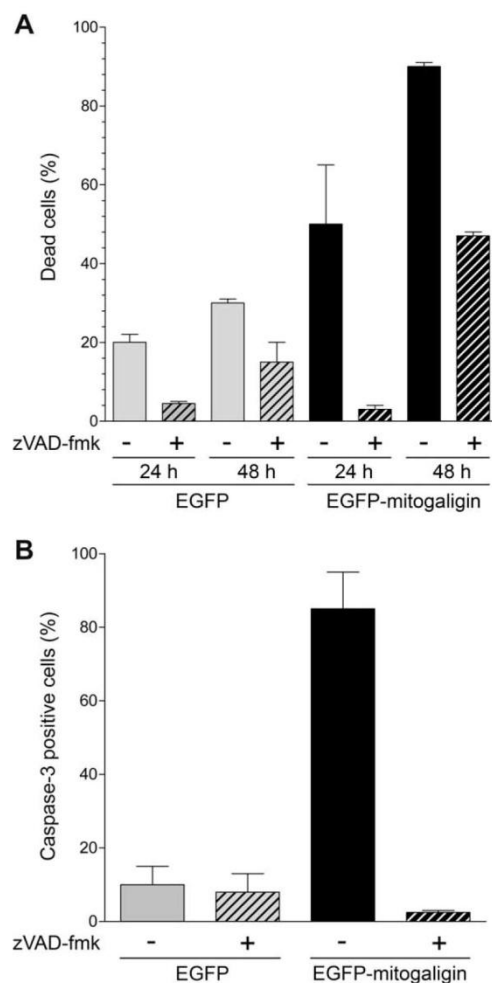


Fig. 2. Cell death induced by EGFP-mitogaligin is dependent on caspase activation. (A) HeLa cells were transfected with plasmids encoding EGFP or EGFP-mitogaligin, in presence (+) or absence (-) of zVAD-fmk, a general caspase inhibitor. Twenty-four and 48 h later, cell death was estimated using fluorescence microscopy. (B) Cells were transfected as in (A) and subsequently incubated with a fluorogenic caspase-3 substrate and analyzed under fluorescence microscopy. Positive cells were counted. The number of cells producing caspase-3 is expressed as a percentage of transfected cells.

Moreover, when EGFP-mitogaligin transfected cells were cultured in presence of the general inhibitor of caspases, zVAD-fmk, the cell death process was clearly slowed down, indicating the requirement of caspase activation (Fig. 2A).

We have then assessed whether the executive caspase-3, a key mediator of apoptosis in mammalian cells, was activated upon nuclear mitogaligin expression, using a caspase-3-specific fluorogenic substrate (Fig. 2B). Forty-eight hours after transfection, no fluorescence resulting from substrate cleavage was detected in cells expressing EGFP alone. On the contrary, in absence of caspase inhibitor, cells expressing the nuclear form of mitogaligin were positive for this labeling thus arguing for caspase-3 activation (Fig. 2B).

DNA damage is a consequence of caspase activation

TUNEL staining assay was insignificant for cells transfected with EGFP up to 48 h (Fig. 3). In contrast, cells expressing EGFP-mitogaligin were almost all positive. When cells were treated with zVAD-fmk, the number of TUNEL positive cells was largely decreased. This observation confirms the implication of caspase activation in the cell death process initiated by EGFP-mitogaligin expression and suggests that caspase activation arises upstream DNA degradation.

The mitochondrial cell death pathway is implicated in the cytotoxicity induced by nuclear mitogaligin

Cytochrome c was detected in mitochondria of EGFP transfected cells without any sign of leakage into the cytosol (Fig. 4A). As most of the cells expressing EGFP-mitogaligin rapidly died after transfection, it was not possible to evaluate the release of cytochrome c from mitochondria. However, when cell death was slowed down by zVAD-fmk, transfected cells exhibited cytochrome c staining in the cytoplasm (Fig. 4A). This result indicates that cytochrome c release induced by EGFP-mitogaligin is an early event occurring before caspase activation.

Nuclear mitogaligin induces translocation of Bax to mitochondria

Under diverse apoptotic conditions, Bax is subject to conformational changes leading to its insertion in the mitochondrial mem-

brane [6,7]. To know whether cell death induced by nuclear mitogaligin generates Bax translocation to mitochondria, HeLa cells were transfected with EGFP-mitogaligin and analyzed by immunofluorescence using an antibody specific for the mitochondrial activated form of Bax (Fig. 4B). Cells expressing the nuclear form of mitogaligin also showed a typical mitochondrial localization of Bax, while cells expressing EGFP alone were negative for this labeling. Such a stain confirms that the mitochondrial cell death pathway is involved in the cytotoxicity resulting from mitogaligin expression.

Discussion

Mitogaligin, a protein with two intracellular localization sequences

Mitogaligin, a cell death protein encoded by *galig*, has been shown to localize to mitochondria [1]. However, thorough observations of HeLa cells transfected with a plasmid encoding mitogaligin-EGFP, indicate a dual localization mitochondria/nucleus in a small number of cells (Fig. 1). This uneven distribution is reminiscent of an “eclipsed distribution”, a common phenomenon associated with proteins found in different cellular compartments with unequal distribution [8]. In such cases, detection of minor alternate localizations is rendered difficult because the dominant protein often masks the presence of the minor form. A typical example is p53 which has been described only lately to localize to mitochondria [9].

In order to know whether mitogaligin could exhibit an alternative distribution, EGFP was fused to the N-end of mitogaligin. It has been described that this technical approach frequently invalidates the final localization of mitochondrial proteins (EMBL GFP-cDNA Localisation Project, <http://gfp-cdna.embl.de>). It is currently hypothesized that position of a mitochondrial targeting sequence is critical for its activity and that addition of a reporter protein at the N-end modifies this position, moving it away from the N-terminus [10,11]. For mitogaligin, the specific addressing to mitochondria is also prevented when the reporter protein EGFP is fused at the N-terminal end of mitogaligin (Fig. 1) confirming the inactivation of the mitochondrial targeting sequence. Therefore, if the protein does not contain an additional targeting signal; it was expected to accumulate in the cytosol. On the contrary, EGFP-mitogaligin is essentially associated to the nucleus (Fig. 1). These results indicate that nuclear localization only takes over when the mitochondrial signal is invalidated which suggests that the mitochondrial targeting signal is dominant over the nuclear one. This is not an exception. Mitochondrial targeting sequences are generally dominant over other signals because they bind to specific mitochondrial receptors before the end of translation and before exposure of others potential signals [12].

The mechanism for nuclear localization of mitogaligin remains to be elucidated. Sequence analysis does not reveal the presence of a typical nuclear localization sequence. However, preliminary experiments suggest that the nuclear localization results from several internal sequences of mitogaligin suggesting the importance of structural characteristics yet to be described.

The apoptotic mitochondrial pathway is activated upon expression of the nuclear form of mitogaligin

The mitochondrial form of mitogaligin has been previously shown to induce cell death [1,3]. From the results presented in this paper, it appears clearly that, when targeted to the nucleus, the protein also exhibits cytotoxic properties evidenced by cell condensation, shrinkage and detachment from plastic dishes (Fig. 2A).

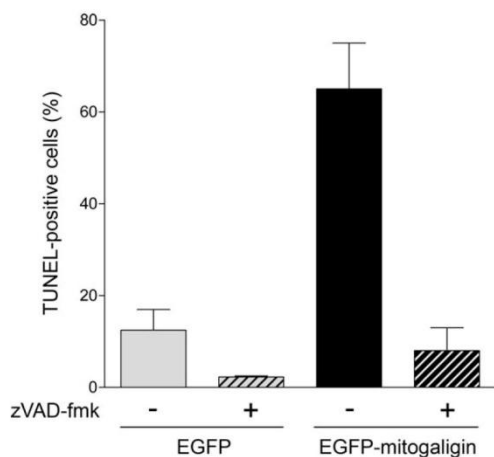


Fig. 3. Cellular DNA is altered upon expression of EGFP-mitogaligin. HeLa cells were transfected with vectors encoding EGFP or EGFP-mitogaligin and incubated in presence (+) or in absence (–) of zVAD-fmk. Forty-eight hours after transfection, cells were analyzed by TUNEL staining. The number of positive cells is expressed as a percentage of transfected cells.

Partie I- Chapitre 1

Activité apoptotique de la mitogaligine nucléaire

P. Gonzalez et al. / Biochemical and Biophysical Research Communications 378 (2009) 816–820

819

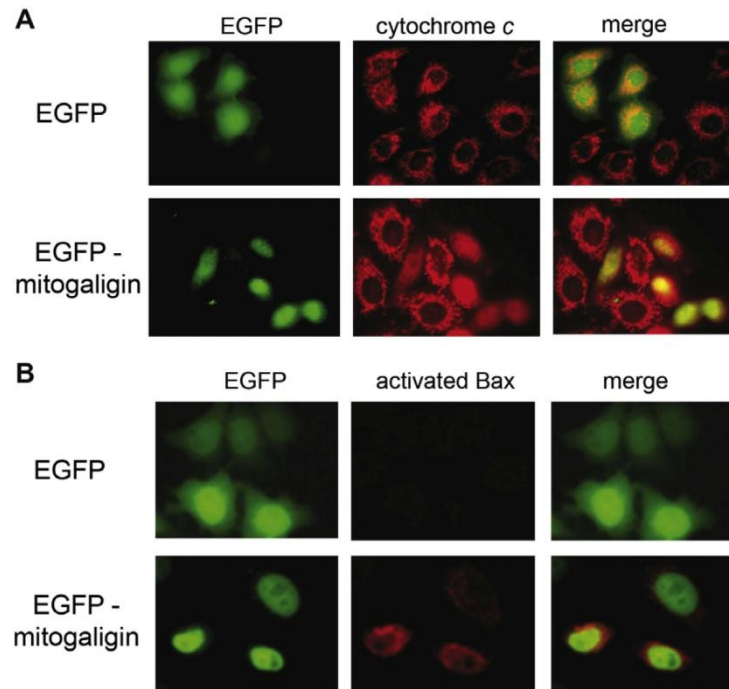


Fig. 4. Nuclear expression of mitogaligin induces the mitochondrial apoptotic pathway. HeLa cells were transfected with pEGFP (EGFP) or pEGFP-MG (EGFP-mitogaligin). (A) Forty-eight hours after transfection and incubation in presence of zVAD-fmk, cells were analyzed for cytochrome c localization (column cytochrome c) and for EGFP expression by fluorescence microscopy (column EGFP). Pictures from both columns were merged (column merge). (B) Forty-eight hours after transfection, localization of activated Bax was revealed by immunofluorescence using a specific antibody. Cells were observed by fluorescence microscopy for EGFP expression (column EGFP), Bax expression (column activated Bax) and pictures were merged (column merge). 400× magnification.

Several lines of evidence indicate that the nuclear form of mitogaligin induces a typical apoptosis process: DNA degradation visualized by TUNEL assay (Fig. 3), implication of caspases evidenced by incubation of cells with zVAD-fmk (Fig. 2A) and activation of caspase-3, a key effector protease during apoptosis (Fig. 2B). Leakage of cytochrome c from mitochondria and mitochondrial localization of activated Bax in transfected cells (Fig. 4A and B), indicate the implication of mitochondria in this apoptotic pathway. As these events were also detected in presence of zVAD-fmk, it can be concluded they take place early upon induction of apoptosis and precede activation of caspases.

Dual localization mitochondria/nucleus is not uncommon and has been reported for other pro-apoptotic proteins. AIF, a mitochondrial protein translocates to the nucleus where it causes DNA fragmentation and promotes the release of cytochrome c from mitochondria [13]. P53 is another example of a protein acting both in nucleus and mitochondria. In mitochondria, p53 functions as a pro-apoptotic BH3-domain protein leading to Bak oligomerization, permeabilization of the outer mitochondrial membrane and release of cytochrome c [9,14,15]. Mitogaligin presents also a remarkable “functional similarity” with the small mitochondrial ARF protein (smARF) [16]. In mitochondria, smARF dissipates the membrane potential and induces cell death [17]. Recently, it has been reported that smARF may also be localized in the nucleoplasm when EGFP is fused to smARF N-terminus [18]. In this case, smARF induces cell death as well, though a different molecular pathway. Finally, several viral pro-apoptotic proteins are also targeted both to the mitochondria and the nucleus [19,20].

Similarly, both mitochondrial and nuclear mitogaligins can induce cell death. In both cases, mitochondria are implicated in this

process. However, the signalling pathways may be different. Cell death induced by nuclear mitogaligin involves caspase-3 activation and DNA fragmentation (Figs. 2B and 3). This is different from what observed with mitochondrial mitogaligin [1]. At the present time, it is difficult to understand if these two different forms have functional interactions or are involved in different signalling pathways.

As mitogaligin can be localized both in mitochondria and nucleus, it will be of interest to consider whether shuttling takes place between the two organelles. Although more work still remains to be performed to understand the function of these different forms of mitogaligin, this study shows for the first time that sorting is implicated in the regulation of mitogaligin cytotoxicity.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Comités Départementaux du Cher et de l'Indre de la Ligue Nationale Contre le Cancer. P.G. and P.R. are supported by fellowships from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. P.G. is also supported by a fellowship from the Association pour la Recherche sur le Cancer.

References

- [1] M. Duneau, M. Boyer-Guittaut, P. Gonzalez, S. Charpentier, T. Normand, M. Dubois, J. Raimond, A. Legrand, Galig a novel cell death gene that encodes a mitochondrial protein promoting cytochrome c release, *Exp. Cell Res.* 302 (2005) 194–205.
- [2] M. Guittaut, S. Charpentier, T. Normand, M. Dubois, J. Raimond, A. Legrand, Identification of an internal gene to the human Galectin-3 gene with two different overlapping reading frames that do not encode Galectin-3, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 2652–2657.

Partie I- Chapitre 1

Activité apoptotique de la mitogaligine nucléaire

820

P. Gonzalez et al. / *Biochemical and Biophysical Research Communications* 378 (2009) 816–820

- [3] P. Gonzalez, M. Duneau, S. Charpentier, T. Normand, L. Mollet, M. Dubois, A. Legrand, Destabilization of membranes containing cardiolipin or its precursors by peptides derived from mitogaligin a cell death protein, *Biochemistry* 46 (2007) 7374–7382.
- [4] D.R. Green, G.I. Evan, A matter of life and death, *Cancer Cell* 1 (2002) 19–30.
- [5] O. Boussif, F. Lezoualc'h, M.A. Zanta, M.D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, J.P. Behr, A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 7297–7301.
- [6] S. Lucken-Ardjomande, S. Montessuit, J.C. Martinou, Contributions to Bax insertion and oligomerization of lipids of the mitochondrial outer membrane, *Cell Death Differ.* 15 (2008) 929–937.
- [7] K.G. Wolter, Y.T. Hsu, C.L. Smith, A. Nechushtan, X.G. Xi, R.J. Youle, Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis, *J. Cell Biol.* 139 (1997) 1281–1292.
- [8] N. Regev-Rudski, O. Pines, Eclipsed distribution: a phenomenon of dual targeting of protein and its significance, *Bioessays* 29 (2007) 772–782.
- [9] N.D. Marchenko, A. Zaika, U.M. Moll, Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 16202–16212.
- [10] K.N. Truscott, N. Pfanner, W. Voos, Transport of proteins into mitochondria, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 143 (2001) 81–136.
- [11] W. Neupert, Protein import into mitochondria, *Annu. Rev. Biochem.* 66 (1997) 863–917.
- [12] J.C. Mueller, C. Andreoli, H. Prokisch, T. Meitinger, Mechanisms for multiple intracellular localization of human mitochondrial proteins, *Mitochondrion* 3 (2004) 315–325.
- [13] S.A. Susin, H.K. Lorenzo, N. Zamzami, I. Marzo, B.E. Snow, G.M. Brothers, J. Mangion, E. Jacotot, P. Costantini, M. Loeffler, N. Larochette, D.R. Goodlett, R. Aebersold, D.P. Siderovski, J.M. Penninger, G. Kroemer, Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor, *Nature* 397 (1999) 441–446.
- [14] C. Sansome, A. Zaika, N.D. Marchenko, U.M. Moll, Hypoxia death stimulus induces translocation of p53 protein to mitochondria detection by immunofluorescence on whole cells, *FEBS Lett.* 488 (2001) 110–115.
- [15] M. Mihara, S. Erster, A. Zaika, O. Petrenko, T. Chittenden, P. Pancoska, U.M. Moll, P53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria, *Mol. Cell* 11 (2003) 577–590.
- [16] S. Reef, E. Zalckvar, O. Shifman, S. Bialik, H. Sabanay, M. Oren, A. Kimchi, A short mitochondrial form of p19ARF induces autophagy and caspase-independent cell death, *Mol. Cell* 22 (2006) 463–475.
- [17] S. Reef, A. Kimchi, A smARF way to die: a novel short isoform of p19ARF is linked to autophagic cell death, *Autophagy* 2 (2006) 328–330.
- [18] Y. Ueda, T. Koya, N. Yoneda-Kato, J.Y. Kato, Small mitochondrial ARF (smARF) is located in both the nucleus and cytoplasm, induces cell death, and activates p53 in mouse fibroblasts, *FEBS Lett.* 582 (2008) 1459–1464.
- [19] P. Boya, A.L. Pauleau, D. Poncet, R.A. Gonzalez-Polo, N. Zamzami, G. Kroemer, Viral proteins targeting mitochondria: controlling cell death, *Biochim. Biophys. Acta* 1659 (2004) 178–189.
- [20] I. Mazur, D. Anhlán, D. Mitzner, L. Wixler, U. Schubert, S. Ludwig, The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 regulates viral polymerase activity by interaction with the PB1 protein, *Cell. Microbiol.* 10 (2008) 1140–1152.

Chapitre 2 : Détermination du signal de localisation nucléaire de la mitogaligine

Introduction

Le chapitre précédent montre que la mitogaligine peut être adressée au noyau pour y induire l'apoptose. Ces observations permettent de supposer l'existence d'un signal de localisation nucléaire qui serait masqué par le signal d'adressage mitochondrial. De ce fait, nous avons voulu identifier un tel signal. Des études ont montré que plus de 50% des protéines nucléaires ont une séquence consensus caractéristique pour leur localisation (Lange *et al*, 2007). Cependant, cela ne semble pas le cas pour notre protéine. En effet, une prédiction sur la séquence du signal nucléaire de la mitogaligine, réalisée avec le logiciel Nucleo (<http://pprowler.itee.uq.edu.au/Nucleo-Release-1.0/>), ou encore NucPred (<http://www.sbc.su.se/maccallr/nucpred/>), ne prédit aucun signal. Afin de localiser un tel signal par l'expérience, nous avons utilisé une stratégie classique en construisant des vecteurs codant différents fragments de la mitogaligine insérés à l'extrémité C-terminale de l'EGFP. Les résultats montrent que ce signal n'est pas conventionnel. En effet, l'adressage nucléaire de la mitogaligine ne provient pas d'une séquence consensus typique. La mitogaligine est traduite à partir de l'exon 3 du gène de la galectine-3, connu pour être composé d'une séquence d'ADN répétitive de 204 paires de bases (Cherayil *et al*, 1990 ; Oda *et al*, 1991 ; Raz *et al*, 1991). Nous nous sommes intéressés à savoir si cette structure en répétitions était importante dans la fonctionnalité du signal. De fait, nos résultats vont dans ce sens, ce qui constitue un type de signal de localisation nucléaire décrit pour la première fois à ce jour.

Les résultats de ce chapitre ont été publiés dans le journal *Biochemical and Biophysical Research Communications* :

Robinet P, Mollet L, Gonzalez P, Normand T, Charpentier S, Brulé F, Dubois M, Legrand A. 2010. The mitogaligin protein is addressed to the nucleus via a non-classical localization signal. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **392**: 53-57.

Article

Biochemical and Biophysical Research Communications 392 (2010) 53–57



Contents lists available at [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc



The mitogaligin protein is addressed to the nucleus via a non-classical localization signal

Pauline Robinet, Lucile Mollet, Patrick Gonzalez¹, Thierry Normand, Stéphane Charpentier, Fabienne Brulé, Martine Dubois, Alain Legrand*

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 December 2009

Available online 7 January 2010

Keywords:

Unconventional nuclear localization signal

Mitogaligin

Dual localization

ABSTRACT

Mitogaligin, a protein encoded by *galig*, an internal cytotoxic gene of the galectin-3 locus, is mostly a mitochondrial protein. Mitochondrial targeting is due to an already identified mitochondrial localization signal. Interaction of mitogaligin with mitochondria leads to cytochrome *c* cytosolic leakage and ultimately to cell death. We have previously pointed out that mitogaligin can also be directed to the nucleus when the mitochondrial addressing signal is inactivated, indicating a possible dual intracellular localization of the protein. When expressed in the nucleus, mitogaligin exhibits also apoptotic properties leading to cell death. In this report, we show that nuclear addressing of mitogaligin depends on a sequence differing from classical signals containing basic, lysine or proline-tyrosine rich residues. The signal consists of a long sequence of amino acids residues based on a series of a short repetitive degenerated sequence.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

We have previously identified a cell death inducer gene, *galig*, located within the human galectin-3 locus [1,2]. The gene produces two unrelated proteins encoded from two overlapping open reading frames. Expression of this gene causes cell shrinkage, cytoplasm vacuolization, nuclei condensation, and eventually cell death. These alterations are associated with extramitochondrial release of cytochrome *c* and aggregation of mitochondria [2]. Mitogaligin, one of the two proteins produced by *galig*, is a 96 amino acid protein highly cationic and exceptionally rich in tryptophan residues [1]. This protein is mainly localized in mitochondria, destabilizing its membrane by an unknown process which involves interaction with cardiolipin [3], a specific phospholipid of mitochondria [4]. The mitochondrial addressing of mitogaligin relies on the already described internal sequence (residues 31–47) [2,3].

Fluorescent microscopy observations regularly indicate that a minor fraction of mitogaligin is specifically targeted to the nucleus [5]. This uneven distribution, or eclipsed distribution, is commonly associated with proteins targeted to different cellular compartments [6]. In addition, we have shown that neutralization of the mitochondrial localization signal, unmasks specific addressing to nucleus. Interestingly, nuclear mitogaligin also induced cell death through a pathway exhibiting typical properties of apoptosis at

the morphological level (cell shrinkage, cytoplasm vacuolization, and nuclei condensation) and at the molecular level (caspase activation, DNA fragmentation, translocation of Bax from cytosol to mitochondria) [5]. These observations indicated that mitogaligin might express cytotoxic properties not only when addressed to mitochondria but also when targeted to the nucleus.

These results suggested that mitogaligin contains two localization signals, a major mitochondrial one and a minor nuclear one, active when the mitochondrial localization signal is invalidated. This is not unusual because mitochondrial signals are generally recognized during translation and before appearance of other targeting peptides [7]. Thus, moving a mitochondrial targeting sequence away from the N-terminus frequently weakens its recognition [8,9]. This phenomenon has also been observed for mitogaligin, and we have shown that the mitochondrial targeting sequence of the peptide, i.e. amino acid (31–47), is invalidated when EGFP is fused to the N-terminal part of mitogaligin. In these conditions, the nuclear signal predominates and mitogaligin accumulates in the nucleus [5].

In this paper, we have undertaken to delineate such a signal sequence using truncated forms of mitogaligin. Our data point out that mitogaligin targeting to the nucleus results from a non-conventional signal, unrelated to already known nuclear localization signal (NLS) and associated to a repetitive domain of mitogaligin.

Materials and methods

Cell line and transfections. HeLa cells (ATCC, CCL-2) were cultured in E-MEM medium (Invitrogen) plus 10% fetal calf serum (Invitro-

* Corresponding author. Fax: +33 238255540.

E-mail address: alain.legrand@cnrs-orleans.fr (A. Legrand).

¹ Present address: Children's Hospital, Forschungslabor, Eythstrasse 24, Haus 16, 89075 ULM, Germany.

Partie I- Chapitre 2

Détermination du signal de localisation nucléaire de la mitogaligine

54

P. Robinet et al. / Biochemical and Biophysical Research Communications 392 (2010) 53–57

gen). Transfections were performed using DNA-polyethylenimine complexes [10], as described [1]. Twenty-four or 48 h after transfection, HeLa cells were fixed in 4% paraformaldehyde and analyzed by confocal fluorescence microscopy (LSM510, Carl Zeiss S.A.S.) using fluorescein filters (excitation at 488 nm and detection at 520 nm).

Expression vectors. Construction of the plasmid pEGFP-MG, used as a reference in this work, has previously been described [5]. This vector produces EGFP fused to the N-terminus of mitogaligin (EGFP-mitogaligin). pEGFP-MG was used as a template for PCRs to generate plasmids encoding truncated from of EGFP-mitogaligin. The resulting plasmids were designed according to the remaining residues of mitogaligin. For example pEGFP-MG(18–60) indicates that the plasmid produces the chimeric protein containing EGFP and residues 18–60 of mitogaligin.

Results

The repetitive domain of mitogaligin is a non-conventional NLS

Conventional NLS sequences consist of short sequences rich in positive charges and the signals may have mono- or bipartite organizations [11–16]. Analysis of the mitogaligin primary structure with different software dedicated to prediction of cellular localization revealed no apparent classical NLS. Although mitogaligin is highly positively charged due to 12 arginine residues, these charges are not clustered but rather regularly distributed along the protein (Fig. 1A). Mitogaligin is encoded by the third exon of the galectin-3 gene, in an alternative reading frame of galectin-3. This exon is essentially composed of repetitive DNA which generates a repetitive domain made of 8 U containing nine amino acid residues [17–19]. In mitogaligin, this domain corresponds to resi-

dues 13–86 (Fig. 1A). All units contain one or two positive charges thus explaining why they are somewhat regularly spaced.

We wondered whether the nuclear accumulation of EGFP-mitogaligin was related to this particular primary structure of mitogaligin. To test this hypothesis, the plasmid pEGFP-mitogaligin-(13–86) encoding EGFP fused to the repetitive domain of mitogaligin, was constructed. This recombinant protein does not contain the 12 N-terminus and 11 C-terminus amino acid residues of mitogaligin. Upon transfection of HeLa cells, green fluorescence was restricted to the nucleus as observed for the parental protein (Fig. 1B). The nuclear fluorescence was not due to an artifact such as EGFP cleavage because the dual labeling obtained using an anti-mitogaligin antibody, tagged the nucleus as well (data not shown). This observation firstly indicates that the nuclear targeting of mitogaligin does not involve the 12 first and 11 last amino acid residues and secondly that the repetitive domain of the protein is sufficient to function as a nuclear transportation signal.

Serial deletions of C-terminal and N-terminal residues of mitogaligin

To further localize the boundaries of the nuclear targeting sequence, we applied the conventional strategy which consists in serial deletions starting from the C-terminal or the N-terminal ends of mitogaligin. Both categories of deletions were generated from the plasmid pEGFP-MG encoding the chimeric EGFP-mitogaligin (Fig. 1B). These plasmids were transfected into HeLa cells and observed under fluorescence microscopy. No difference of localization between mutants and the full protein was noted when the first 60 residues of mitogaligin were conserved (Fig. 2A, EGFP-MG(01–74), EGFP-MG(01–60)). In contrast, nuclear accumulation was abolished with plasmids encoding shorter forms of mitogaligin (Fig. 2A, EGFP-MG(01–46), EGFP-MG(01–38), EGFP-MG(01–30)).

In parallel, serial deletions from the N-terminus of mitogaligin were also generated from the same parental plasmid. Nuclear localization was not affected upon withdrawal of the 30 first residues of mitogaligin (Fig. 2B, EGFP-MG(31–97)). Shorter forms of mitogaligin were clearly delocalized into cytosol (Fig. 2B, EGFP-MG(38–97), EGFP-MG(42–97), EGFP-MG(48–97), EGFP-MG(74–97)). These results do not help to delineate very precisely the mitogaligin nuclear addressing sequence. However, they suggest that it lies within the core region of mitogaligin, between residues 31 and 60.

The central region of mitogaligin is not sufficient for nuclear accumulation

Considering these results, it was expected that transfection of a plasmid encoding a chimeric protein containing EGFP fused to residues (31–60) of mitogaligin would produce a nuclear protein. Sequence was not enough to function as such as a nuclear location signal.

These astonishing results suggested that additional sequences were necessary to get a functional addressing signal. Therefore, we have performed extensions of the central region (31–60) of mitogaligin downstream and upstream (Fig. 3B and C). Extension of the (31–60) sequence to (31–79) restored nuclear targeting. Likewise, nuclear targeting was also observed when the sequence (31–60) was extended from its N-terminal end. While sequence (18–60) was not sufficient for nuclear localization, sequence (13–60) induced a net recovering of nuclear targeting (Fig. 3C). In summary, only one of these two additional sequences located on each sides of (31–60) is necessary to restore nuclear addressing in conjunction with (31–60).

At this stage, the central region of mitogaligin seemed imperative for nuclear localization, and it was expected that deletion of the (31–46) region of mitogaligin in EGFP-mitogaligin would generate a cytosolic protein. Surprisingly, such a protein was clearly localized into the nucleus (Fig. 4A). Consequently, the structure

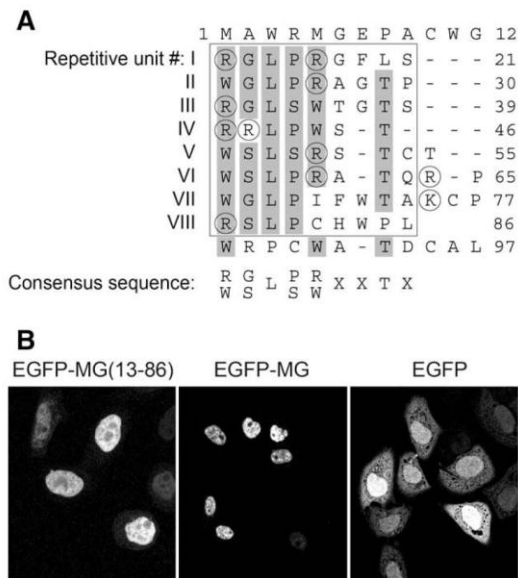


Fig. 1. Repetitive domains in mitogaligin sequence and subcellular localization of full mitogaligin. (A) Eight repetitive units (numbered I–VIII) are evidenced in the mitogaligin amino acid sequence. DNA repetitive domain encodes amino acid sequence from R13 to L86. The eight repetitive units are arranged according to the best alignment. Highlighted letters represent conserved amino acid residues. Circles surround positively charged amino acids. The consensus sequence deduced from this repetitive domain is: R₅₀/W₅₀-G₅₀/S_{37,5}-L₁₀₀-P₇₅-S₂₅-R₅₀/W₂₅-X-X-T₇₅-X. (B) HeLa cells were transfected with plasmids encoding EGFP-MG(13–86), EGFP-MG and EGFP and analyzed under confocal microscopy.

Partie I- Chapitre 2

Détermination du signal de localisation nucléaire de la mitogaligine

P. Robinet et al./Biochemical and Biophysical Research Communications 392 (2010) 53–57

55

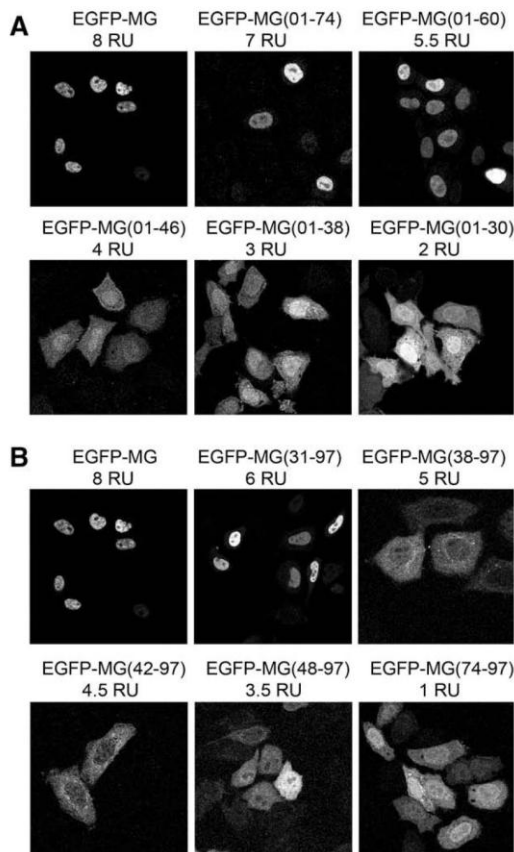


Fig. 2. Subcellular localization of EGFP-mitogaligin mutants. Plasmids encoding truncated forms of EGFP-mitogaligin were constructed and transfected in HeLa cells. Twenty-four hours after transfection, cells were fixed and observed under confocal microscopy. (A) Deletions from the C-terminal end of mitogaligin in EGFP-mitogaligin. Plasmids encode full mitogaligin (MG), MG(01–74), MG(01–60), MG(01–46), MG(01–38) or MG(01–30), all fused to EGFP. (B) Deletions from the N-terminal part of mitogaligin in EGFP-mitogaligin. Plasmids encode MG(31–97), MG(38–97), MG(42–97), MG(48–97) or MG(74–97). For each construct, the number of repetitive units (RU) is indicated.

of the nuclear signal of mitogaligin is more complex that can be anticipated for a conventional NLS [13].

The nuclear localization of mitogaligin is related to the number of repetitive units

The data generated above displayed apparent contradictory results. From deletion experiments in Fig. 2, the sequence (31–60) appeared important for nuclear targeting function. However, the sequence by itself was not sufficient for accurate addressing and one additional sequence belonging to mitogaligin-(01–30) or mitogaligin-(60–79) needed to be present for nuclear localization. Furthermore, deletion of the sole sequence (31–46) of mitogaligin in EGFP-mitogaligin did not prevent nuclear distribution. To resolve these apparent contradictions, we reasoned that each repetitive unit displays a weak nuclear targeting signal not active enough by itself for nuclear addressing. As mitogaligin is essentially translated from repetitive DNA, the signal would be the result of the accumulation of the corresponding repetitive units that combinatorially contributes to overall nuclear localization. Table 1 reports

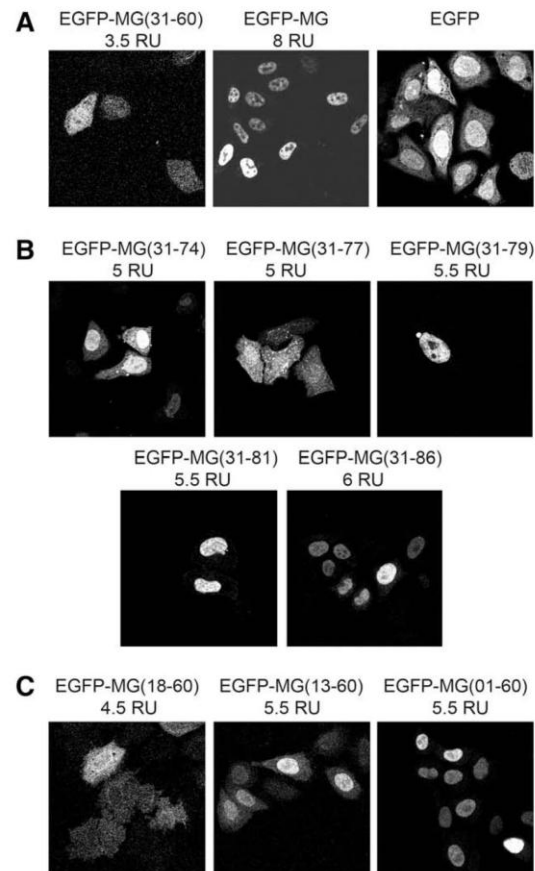


Fig. 3. The nuclear localization of mitogaligin is not related to a single short NLS. Plasmids encoding modified forms of EGFP-mitogaligin were transfected in HeLa cells. Expression was analyzed under confocal microscopy. (A) Transfection of a plasmid encoding the core region of mitogaligin (31–60) is not sufficient for nuclear localization. (B) Extension of the C-terminus of sequence (31–60) restores nuclear targeting. Transfected plasmids encode MG(31–74), MG(31–77), MG(31–79), MG(31–81), and MG(31–86) fused to EGFP. (C) Extension of the N-terminus of sequence (31–60) also restores nuclear targeting of mitogaligin. Plasmids encode MG(01–60), MG(13–60), and MG(18–60). For each construct, the number of repetitive units (RU) is indicated.

the repeated unit composition of mitogaligin in all the vectors used above. Indeed, the significant difference between these vectors was the number of repetitive units. In fact, all truncated forms of mitogaligin with five complete repetitive units or less exhibited cytosolic distribution while mutated mitogaligins containing more than five integral units had a nuclear localization.

To test whether the number of repetitive units was indeed more critical than the actual sequence for the nuclear addressing function, a vector containing a duplication of the sequence (31–60) has been constructed. This plasmid produces a recombinant protein with seven full repetitive units versus 3.5 for the vector containing a single copy of the sequence (31–60) and eight for the plasmid expressing the whole nuclear mitogaligin. Transfection experiments indicated that the protein constituted by the two linked sequences (31–60) was nuclear (Fig. 4B, right) while the vector with no duplication produced a cytosolic protein (Fig. 4B, left). Thus, increasing the number of repetitive units is sufficient to enhance the nuclear targeting function.

Partie I- Chapitre 2

Détermination du signal de localisation nucléaire de la mitogaligine

56

P. Robinet et al./Biochemical and Biophysical Research Communications 392 (2010) 53–57

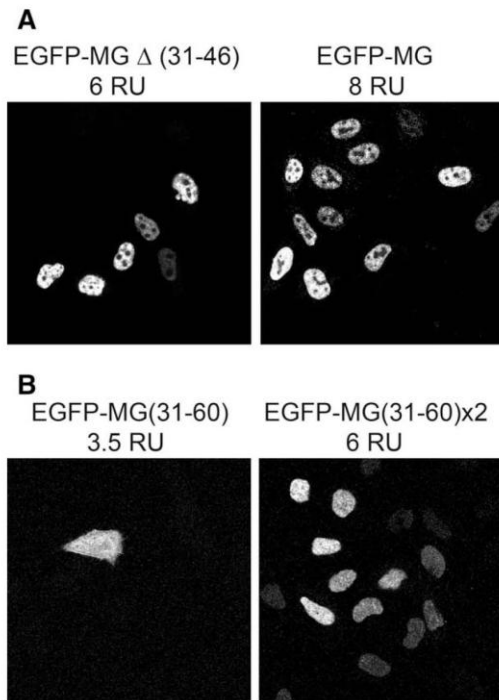


Fig. 4. (A) Deletion of the region (31–46) of mitogaligin in the plasmid pEGFP-MG does not modify nuclear localization. Cells were transfected with pEGFP-MG Δ(31–46), a vector encoding mitogaligin devoid of the sequence 31–46 (left panel) or pEGFP-MG, a vector encoding EGFP-mitogaligin (right panel). Twenty-four hours after transfection, cells were observed under confocal microscopy. Numbers of repetitive units (RU) are indicated. (B) Nuclear localization of mitogaligin depends on the number of repetitive units. Left panel: plasmid pEGFP-MG(31–60) encodes sequence 31–60 of mitogaligin fused to EGFP and contains about 3.5 U of the repetitive sequence (see text). Right panel: plasmid pEGFP-MG(31–60) × 2 contains a duplication of the same sequence also fused to EGFP and includes seven complete repetitive units. Twenty-four hours after transfection, cells were analyzed with confocal microscopy.

Discussion

The experiments presented in this report lead to the conclusion that the nuclear targeting sequence of mitogaligin constitutes a new class of nuclear addressing signal. This result is really not surprising considering, as mentioned above, that the primary structure of mitogaligin reveals no predictable NLS. Although the primary structure of mitogaligin contains an abundance of basic residues, these residues are not clustered as it has been described for a numerous of mono-, bi- or tripartite signals [20].

We used the classical experimental approach to delineate the targeting signal, based on transfection of plasmids encoding truncated forms of mitogaligin fused to the C-terminal end of EGFP. A first set of experiments indicated that the mitogaligin nuclear addressing sequence was related to the (13–86) repetitive domain of the protein (Fig. 1). This made a first difference with other known NLS which do not exhibit such a repetitive structure even for non-conventional sequences [21].

Serial deletions, used to delineate more precisely the mitogaligin addressing sequence boundaries, generated unexpected and apparent contradictory results. Fig. 2 revealed the importance of residues between 31 and 60. The role of this sequence in the nuclear targeting of mitogaligin was reinforced by the fact that replacement of an arginine doublet (R₄₀R₄₁) with glutamate residues in mitogaligin-(01–

Table 1

Numbers of repetitive units (RU) and cellular localization of the modified mitogaligins. All mutant mitogaligins are in fusion with EGFP at their N-terminus. N/C stands for nucleus/cytosol. Localizations were determined under confocal microscopy. MG (first lane) is the complete mitogaligin. The repetitive units (RU) were numbered according to Fig. 1A nomenclature.

Proteins	Fig.	Numbers of complete RU	Additional residues from incomplete RU	Localization
MG	1–4A	8 (I–VIII)	0	N
MG(13–86)	1B	8 (I–VIII)	0	N
MG(01–74)	2A	7 (I–VII)	0	N
MG(31–60) × 2	4B	2 × 3 (III–V)	2 × 5 (VI)	N
MG(31–97)	2B	6 (III–VIII)	0	N
MG(31–86)	3B	6 (III–VIII)	0	N
MG Δ(31–46)	4A	6 (I–II, V–VIII)	0	N
MG(01–60)	2A, 3C	5 (I–V)	5 (VI)	N
MG(13–60)	3C	5 (I–V)	5 (VI)	N
MG(31–81)	3B	5 (III–VII)	4 (VIII)	N
MG(31–79)	3B	5 (III–VII)	2 (VIII)	N
MG(38–97)	2B	5 (IV–VIII)	1 (III)	C
MG(31–74)	3B	5 (III–VII)	0	C
MG(31–77)	3B	5 (III–VII)	0	C
MG(18–60)	3C	4 (II–V)	3 (I) + 5 (VI)	C
MG(42–97)	2B	4 (V–VIII)	5 (IV)	C
MG(01–46)	2A	4 (I–IV)	0	C
MG(48–97)	2B	3 (VI–VIII)	7 (V)	C
MG(31–60)	3A, 4B	3 (III–V)	5 (VI)	C
MG(01–38)	2A	2 (I–II)	8 (III)	C
MG(01–30)	2A	2	0	C
MG(74–97)	2B	1 (VIII)	0	C

60) or mitogaligin-(31–97) diminishes considerably the nuclear localization (data not shown). However, peptide (31–60) was clearly insufficient to independently function as a nuclear targeting signal (Fig. 3A). Recovering of the nuclear addressing function required an extension of sequences located upstream or downstream to the (31–60) peptide (Fig. 3B and C). Surprisingly, removal of mitogaligin region (31–46) did not prevent nuclear addressing indicating that this sequence was not essential (Fig. 4A).

The simplest interpretation for these contradictory observations is to consider the mitogaligin nuclear transportation sequence as a modular structure: each repetitive unit in mitogaligin constitutes a weak functional addressing signal and the efficient nuclear localization results from the cooperation between these repetitive units. Nuclear localization is always observed when the recombinant mitogaligin contains more than five complete units of the repetitive sequence while a cytosolic localization is constantly detected when five or less repetitive units are present (Table 1). In other words, in mitogaligin, each repetitive unit independently exhibits a low affinity for its carrier and synergy, achieved by more than 5 U, generates sufficient avidity to constitute a functional targeting signal. Consequently, in order to get efficient addressing of mitogaligin to nucleus, the number of repetitive units is more critical than the sequence *per se*. This can explain the fact that the mitogaligin nuclear addressing signal is exceptionally long when compared to a classical NLS [20]. The mutant EGFP-mitogaligin-(31–60) illustrates this modular structure. This mutant contains about 3.5 repetitive units and appears diffused in the cytoplasm confirming that this sequence is not sufficient to display addressing function. However, duplication of the same sequence, (31–60), induces nuclear targeting (Fig. 4B).

The following degenerate consensus sequence of the repetitive unit can be established: [W/R]-[G/S]-L-[P/S]-[R/W]-X-X-T-X. The first five residues of the repetitive units are much more conserved than the C-terminal end for each unit. As compared to the different

Partie I- Chapitre 2

Détermination du signal de localisation nucléaire de la mitogaligine

P. Robinet et al./Biochemical and Biophysical Research Communications 392 (2010) 53–57

57

classes of classical NLS which harbor clusters of basic amino acid residues, the repetitive units contain one or two positively charged residues. This constitutes another major difference. Accumulation of more or less regularly spaced basic residues, due to addition of the repetitive units could be the key to generate an efficient signal.

The sequence of mitogaligin required for nuclear targeting is particularly long as compared to classical NLS. However, this is not a unique case. An increasing number of cellular or viral proteins have been found to utilize non-classical NLS for nuclear localization [22–28]. For example, the nuclear localization sequence of VP22, a viral protein from bovine herpesvirus 1, is a 103 amino acid sequence [28]. However, a major difference with mitogaligin is that no repetitive domain is found within the sequence. Interestingly, like mitogaligin, VP22 also contains a mitochondrial addressing signal which overlaps the nuclear localization signal [28]. It is thought that these long NLS are more related to their structure rather than to their linear sequence. The deletion experiments support the hypothesis that it can be the same for mitogaligin. The structure of mitogaligin has yet to be characterized. Because mitogaligin does not present structural homology with other known proteins, such a structure will have to be elucidated through experimental procedures.

In summary, we have characterized a new type of nuclear importation signal. This sequence does not match a minimal consensus for other known classical NLS. The mitogaligin nuclear addressing signal presents a modular organization based on addition of eight repetitive units of nine amino acid residues indicating that the sequence is much longer than classical NLS. However, the mitogaligin targeting sequence can be shortened but should contain at least five complete units to be functional. This structure can explain the fact that the mitochondrial localization signal (MLS) is dominant over the nuclear signal. It is known that MLS are recognized during translation [7]. Consequently, the mitogaligin MLS could be recognized before translation of the whole long nuclear addressing domain occurred. The mechanism of importation of this new type of NLS remains to be elucidated.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Comités Départementaux du Cher et de l'Indre de la Ligue Nationale Contre le Cancer. P.R. is supported by a fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

References

- [1] M. Guittaut, S. Charpentier, T. Normand, M. Dubois, J. Raimond, A. Legrand, Identification of an internal gene to the human Galectin-3 gene with two different overlapping reading frames that do not encode Galectin-3, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 2652–2657.
- [2] M. Duneau, M. Boyer-Guittaut, P. Gonzalez, S. Charpentier, T. Normand, M. Dubois, J. Raimond, A. Legrand, Galig, a novel cell death gene that encodes a mitochondrial protein promoting cytochrome c release, *Exp. Cell Res.* 302 (2005) 194–205.
- [3] P. Gonzalez, M. Duneau, S. Charpentier, T. Normand, L. Mollet, M. Dubois, A. Legrand, Destabilization of membranes containing cardiolipin or its precursors

- by peptides derived from mitogaligin, a cell death protein, *Biochemistry* 46 (2007) 7374–7382.
- [4] D. Ardail, J.P. Privat, M. Egret-Charlier, C. Levrat, F. Lerme, P. Louisot, Mitochondrial contact sites. Lipid composition and dynamics, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 18797–18802.
- [5] P. Gonzalez, P. Robinet, S. Charpentier, L. Mollet, T. Normand, M. Dubois, A. Legrand, Apoptotic activity of a nuclear form of mitogaligin, a cell death protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 378 (2009) 816–820.
- [6] N. Regev-Rudzki, O. Pines, Eclipsed distribution: a phenomenon of dual targeting of protein and its significance, *Bioessays* 29 (2007) 772–782.
- [7] J.C. Mueller, C. Andreoli, H. Prokisch, T. Meitinger, Mechanisms for multiple intracellular localization of human mitochondrial proteins, *Mitochondrion* 3 (2004) 315–325.
- [8] K.N. Truscott, N. Pfanner, W. Voos, Transport of proteins into mitochondria, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 143 (2001) 81–136.
- [9] W. Neupert, J.M. Herrmann, Translocation of proteins into mitochondria, *Annu. Rev. Biochem.* 76 (2007) 723–749.
- [10] O. Boussif, F. Lezoualc'h, M.A. Zanta, M.D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, J.P. Behr, A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 7297–7301.
- [11] D. Kalderon, B.L. Roberts, W.D. Richardson, A.E. Smith, A short amino acid sequence able to specify nuclear location, *Cell* 39 (1984) 499–509.
- [12] C.V. Dang, W.M. Lee, Identification of the human c-myc protein nuclear translocation signal, *Mol. Cell. Biol.* 8 (1988) 4048–4054.
- [13] C. Dingwall, R.A. Laskey, Nuclear targeting sequences – a consensus?, *Trends Biochem. Sci.* 16 (1991) 478–481.
- [14] J. Robbins, S.M. Dilworth, R.A. Laskey, C. Dingwall, Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence, *Cell* 64 (1991) 615–623.
- [15] D.L. Sherman, P.J. Brophy, A tripartite nuclear localization signal in the PDZ-domain protein ι -periaxin, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 4537–4540.
- [16] S.C. Hsu, M.C. Hung, Characterization of a novel tripartite nuclear localization sequence in the EGFR family, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 10432–10440.
- [17] B.J. Cherayil, S. Chaitovitz, C. Wong, S. Pillai, Molecular cloning of a human macrophage lectin specific for galactose, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990) 7324–7328.
- [18] Y. Oda, H. Leffler, Y. Sakakura, K. Kasai, S.H. Barondes, Human breast carcinoma cDNA encoding a galactoside-binding lectin homologous to mouse Mac-2 antigen, *Gene* 99 (1991) 279–283.
- [19] A. Raz, P. Carmi, T. Raz, V. Hogan, A. Mohamed, S.R. Wolman, Molecular cloning and chromosomal mapping of a human galactoside-binding protein, *Cancer Res.* 51 (1991) 2173–2178.
- [20] A. Lange, R.E. Mills, C.J. Lange, M. Stewart, S.E. Devine, A.H. Corbett, Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin α , *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 5101–5105.
- [21] H. Siomi, G. Dreyfuss, A nuclear localization domain in the hnRNP A1 protein, *J. Cell Biol.* 129 (1995) 551–560.
- [22] T. Wolff, G. Unterstab, G. Heins, J.A. Richt, M. Kann, Characterization of an unusual importin α binding motif in the borna disease virus p10 protein that directs nuclear import, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 12151–12157.
- [23] A. Kretsovali, C. Spiliakakis, A. Dimakopoulos, T. Makatounakis, J. Papamatheakis, Self-association of class II transactivator correlates with its intracellular localization and transactivation, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 32191–32197.
- [24] P. Lischka, G. Sorg, M. Kann, M. Winkler, T. Stamminger, A nonconventional nuclear localization signal within the UL84 protein of human cytomegalovirus mediates nuclear import via the importin α /beta pathway, *J. Virol.* 77 (2003) 3734–3748.
- [25] E. Lombardo, J.C. Ramirez, J. Garcia, J.M. Almendral, Complementary roles of multiple nuclear targeting signals in the capsid proteins of the parvovirus minute virus of mice during assembly and onset of infection, *J. Virol.* 76 (2002) 7049–7059.
- [26] C. Lufei, X. Cao, Nuclear import of Pin1 is mediated by a novel sequence in the PPIase domain, *FEBS Lett.* 583 (2009) 271–276.
- [27] P. Wang, P. Palese, R.E. O'Neill, The NPI-1/NPI-3 (karyopherin α) binding site on the influenza A virus nucleoprotein NP is a nonconventional nuclear localization signal, *J. Virol.* 71 (1997) 1850–1856.
- [28] J. Zhu, Z. Qiu, C. Wiese, Y. Ishii, J. Friedrichsen, G. Rajashekara, G.A. Splitter, Nuclear and mitochondrial localization signals overlap within bovine herpesvirus 1 tegument protein VP22, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 16038–16044.

Conclusions, Discussion et Perspectives

Les signaux de localisation nucléaire « classiques »

Le plus souvent, les protéines nucléaires contiennent au sein de leur structure primaire, des informations qui leur permettent d'être spécifiquement adressées au noyau (Dingwall *et al*, 1982) en s'associant avec le récepteur cytosolique de l'Importine (Görlich *et al*, 1996). Ces NLS (*Nuclear Localization Signal*) sont généralement constitués d'un groupe d'acides aminés basiques. Le cas le plus connu est le NLS de la protéine grand T du virus SV40 (Simian Virus 40 large T-Antigen) composé de **PKKKRKV** (Kalderon *et al*, 1984). En ce qui concerne la mitogaline, bien qu'elle soit également chargée positivement, aucune séquence de ce type ne peut être mise en évidence, les charges étant réparties tout le long de la molécule.

D'autres études ont démontré que certains signaux NLS peuvent contenir, en plus de quelques résidus basiques, des acides aminés acides ou neutres. Pour exemple, citons le NLS de la protéine c-myc : **PAAKRVKLD** où les résidus PAA et LD sont indispensables à l'activation du NLS et ont un positionnement crucial au sein de la séquence du NLS (Makkerh *et al*, 1996).

Il est également admis que certains NLS peuvent être formés non plus d'un groupe mais de deux groupes de résidus basiques séparés par un espace indépendant du NLS. La première protéine identifiée comme telle est la Nucléoplasmine dont le NLS est **KRPAATKAGQAKKKK** (Robbins *et al*, 1991). Ce signal est décrit comme bipartite.

Depuis, beaucoup d'autres NLS de protéines nucléaires ont été identifiés (Brameier *et al*, 2007).

Le signal de localisation nucléaire atypique de la mitogaline

La séquence d'adressage nucléaire de la mitogaline constitue un nouveau type de NLS. Ce résultat n'est pas surprenant dans la mesure où aucun signal n'avait été prédit par analyse des séquences en bioinformatique. Bien que la structure primaire de la mitogaline contienne de nombreux résidus basiques, ces résidus ne sont pas regroupés comme décrit dans les NLS classiques, bi ou tri-partite (Lange *et al*, 2007). L'approche expérimentale classique pour délimiter le signal d'adressage nucléaire de la mitogaline, consiste en une série de délétions de la protéine. Les résultats présentés dans l'article précédent révèlent un signal de localisation nucléaire qui pourrait faire penser à un système modulaire. La mitogaline est codée par l'exon 3 du gène de la galectine-3 selon un cadre de lecture alternatif de la galectine-3. Cet exon est composé d'une séquence d'ADN répétitive de 204 pb (Cherayil *et al*, 1990 ; Raz *et al*, 1991 ; Oda *et al*, 1991) qui génère un domaine répétitif de 8 unités de 9 acides aminés sur le fragment compris entre les résidus 13 et 85 de la mitogaline. Chaque unité, contient 1 voir 2 résidus arginine (exceptée l'unité VII). Une séquence consensus peut être établie : R/W-G/S-L-P/S-R/W-X-X-T-X. La localisation de la mitogaline contenant ces 8 unités de répétition, soit le fragment contenant les résidus 13 à

86, s'est révélée être nucléaire. Les séquences N et C-terminales de la mitogaligine ne sont pas nécessaires pour structurer ce fragment. Ceci suggère donc que la localisation nucléaire de la mitogaligine dépend de cette structure répétitive particulière. Les séquences des mutants de la mitogaligine diffèrent par le nombre d'unités de répétition. La mitogaligine est nucléaire lorsqu'elle contient plus de 5 unités répétitives complètes alors qu'elle est cytosolique quand elle n'en possède que 5 ou moins. L'accumulation des charges positives, due à l'addition d'unités de répétition, pourrait générer un signal efficace pour diriger la protéine au noyau. Le nombre d'unités répétitives serait donc plus critique que la séquence elle-même. Chaque unité pourrait constituer un signal très faible, et c'est l'accumulation de ces unités qui générerait un signal actif. Cela expliquerait alors pourquoi le signal d'adressage nucléaire de la mitogaligine est exceptionnellement long par rapport aux NLS classiques. Il est connu que, mis à part les résidus basiques, la composition en acides aminés des différents types de NLS est très diversifiée. En ce sens, il serait intéressant d'évaluer le rôle de chaque résidu dans le signal d'adressage nucléaire de la mitogaligine.

Les protéines qui contiennent un NLS classique sont importées au noyau *via* un système d'importines α/β . Aussi, il serait intéressant de savoir si la mitogaligine utilise cette même voie pour être adressée au noyau. Le fait que le signal d'adressage nucléaire de la mitogaligine soit relativement long comparé aux NLS classiques n'exclut pas une interaction avec les importines α (Wolff *et al*, 2002). Ces dernières contiennent plusieurs poches de fixation à des NLS, chacune d'entre elles s'accommode avec un simple NLS, ce qui augmente leur capacité d'interaction avec d'autres protéines nucléaires (Conti et Kuriyan, 2000 ; Conti *et al*, 1998 ; Fontes *et al*, 2000). De plus, comme le système importine, le transport nucléaire de la mitogaligine est un système actif, dépendant de l'ATP. En effet, l'azide de sodium (NaN_3), inhibiteur de synthèse d'ATP dans la cellule, provoque la fuite de la protéine dans le cytoplasme (Gonzalez, thèse 2007).

Le fait que le signal d'adressage nucléaire de la mitogaligine soit atypique n'est pas un cas unique. De plus en plus de protéines cellulaires ou virales sont décrites comme utilisant des NLS non classiques pour leur localisation nucléaire (Wolff *et al*, 2002 ; Siomi et Dreyfuss, 1995; Kretsovali *et al*, 2001; Wang *et al*, 1997; Lischka *et al*, 2003; Zhu *et al*, 2005; Lufei *et al*, 2009; Lombardo *et al*, 2002). L'une d'entre elle, la VP22 bovine (*Herpesvirus 1 Tegument Protein*), une protéine virale du virus de l'herpès bovine, contient un NLS long de 103 acides aminés (Zhu *et al*, 2005). La différence avec la mitogaligine est que ce long NLS ne contient pas d'unités répétitives. La protéine VP22, comme la mitogaligine, contient également un signal de localisation mitochondriale qui se chevauche avec le signal de localisation nucléaire (Zhu *et al*, 2005). L'activité des NLS conventionnels ne dépend pas de la structure de la protéine mais de la séquence du signal. Pour la mitogaligine, les unités de répétition étant dispersées, ceci suggère plutôt que la conformation de la protéine doit jouer un rôle. En ce sens, elle pourrait se rapprocher de la protéine VP22 pour laquelle l'activité du long NLS dépend d'hélices alpha et de coudes beta (Zhu *et al*, 2005). La mitogaligine n'apparaît donc pas isolée, et il serait évidemment intéressant de pouvoir caractériser les structures de cette protéine, ce qui permettrait éventuellement de mieux comprendre la nature du signal nucléaire.

Un autre cas atypique, est celui des protéines SR qui sont adressées au noyau *via* des domaines RS qui sont des domaines d'unités répétitives interchangeables de résidus arginine et sérine, espacés ou non par d'autres résidus (Cazalla *et al*, 2002). Les protéines qui possèdent des domaines RS n'utilisent pas le système classique d'importation au noyau, c'est-à-dire le système d'importines α/β , mais utilisent un récepteur d'import nucléaire spécifique tels que TRN-SR1 et TRN-SR2, ayant des séquences similaires avec l'importine β (Kataoka *et al*, 1999 ; Lai *et al*, 2000). La mitogaligine possède quelques domaines RS. Il serait alors intéressant d'étudier l'influence de ces domaines sur la localisation nucléaire de la protéine. Par des techniques de co-immunoprécipitation, nous pourrions déterminer si la mitogaligine utilise un système de transport nucléaire conventionnel (importines) ou spécifique (système de transport des protéines SR).

Régulation du transport nucléaire

La masse moléculaire de la mitogaligine fusionnée à l'EGFP est d'environ 39 kDa, la protéine-chimère peut donc théoriquement diffuser passivement à travers l'enveloppe nucléaire. Pour que l'accumulation de petites protéines nucléaires dans le noyau soit efficace, il faut à la fois un NLS et un signal de rétention nucléaire (Lombardo *et al*, 2002). La détection exclusivement nucléaire de la mitogaligine avec l'anticorps anti-mitogaligine montre que cette protéine est bien adressée au noyau *via* un processus spécifique et non une diffusion passive. Cette observation est confirmée par le fait que son transport dans le noyau dépend d'un NLS non conventionnel et est dépendant de l'ATP (Gonzalez, thèse 2007).

Le transport nucléaire des protéines repose sur plusieurs niveaux de régulation. En particulier la phosphorylation peut jouer un rôle important (Gasiorowski et Dean, 2003). L'accumulation d'une protéine dans le noyau peut être significativement augmentée par sa phosphorylation. Entre autre, la phosphorylation des résidus sérines des domaines RS est nécessaire pour le transport nucléaire par TRN-SR2 (Lai *et al*, 2001). L'un des domaines RS de la mitogaligine concerne l'arginine 40, située en aval de la sérine 39 et de la thréonine 38. Cette arginine 40 possède un rôle important dans la rétention ou le transport au noyau de la mitogaligine (résultat non montré). Les mutations des résidus thréonine 38 et sérine 39 en aspartate, mimant une phosphorylation potentielle délocalisent la mitogaligine des mitochondries au profit du noyau et cytoplasme alors qu'une mutation en alanine, empêchant toute phosphorylation potentielle, maintient la protéine aux mitochondries (voir partie suivante). La phosphorylation de ces résidus dans le domaine RS pourrait permettre le recrutement d'un système d'import spécifique des protéines SR.

Les résidus thréonine 38 et sérine 39 faisant partie intégrante du signal de localisation mitochondriale, on ne peut cependant pas exclure que ces mutations affectent simplement ce MLS. Cependant, leur mutation en alanine n'affecte pas la localisation mitochondriale de la protéine, c'est pourquoi l'hypothèse d'une régulation par phosphorylation est plausible.

 Différence de localisation de la mitogaligine en fonction de la position de la protéine reporteur EGFP

La localisation mitochondriale de la mitogaligine a été déterminée à partir d'une protéine de fusion mitogaligine-EGFP (Duneau *et al*, 2005). La variation de position de l'EGFP de l'extrémité C-terminale à l'extrémité N-terminale de la mitogaligine abolit le signal de localisation mitochondriale et "révèle" le signal nucléaire. En quoi la position de l'EGFP peut-elle être importante ? Cette question n'a pas été posée dans cette étude. Cependant, il est connu que la position des séquences d'adressage mitochondrial dans une protéine est importante. Celles-ci sont généralement localisées à l'extrémité N-terminale de la protéine. Elles sont donc reconnues rapidement et prises en charge dès le début de la synthèse protéique, avant que d'autres signaux éventuels ne soient mis en évidence (Mueller *et al*, 2004). Pour la mitogaligine, le signal mitochondrial est positionné au niveau des résidus 31 à 46. Elle peut donc être rapidement reconnue après le début de sa synthèse protéique. Par contre, lorsque l'EGFP est positionnée en N-terminale de la mitogaligine, le signal d'adressage mitochondrial se retrouve très éloigné et devient localisé dans la partie C-terminale de la protéine de fusion. Il est donc possible qu'il ne soit plus reconnu aussi facilement. De ce fait, une étude a montré que 80% des protéines mitochondriales perdent cette domiciliation lorsqu'on les fusionne à l'extrémité C-terminale de l'EGFP (<http://gfp-cdna.embl.de/index.html>). Le fait d'éloigner le MLS de l'extrémité N-terminale d'une protéine, abolit sa reconnaissance et donc la localisation mitochondriale de la protéine (Truscott *et al*, 2001 ; Neupert et Herrmann, 2007). Dans ces conditions, le signal nucléaire de la mitogaligine peut alors être reconnu et la mitogaligine, dirigée au noyau pour induire l'apoptose (Gonzalez *et al*, 2009).

Contrairement au signal de localisation mitochondriale, il a été montré que les signaux de localisation nucléaire fonctionnent indépendamment de leur position dans la molécule, ce qui permet de penser que leur activité n'est pas altérée par la présence de l'EGFP en amont. Le signal constitué par les séquences répétées de la mitogaligine semble donc également indépendant de leur position dans la protéine chimère. La localisation mitochondriale de la mitogaligine-EGFP n'est pas exclusive. Que ce soit par détection avec l'EGFP, avec un flag, ou bien avec un anticorps anti-mitogaligine, certaines cellules présentent un noyau positif pour la protéine de fusion.

De plus, la GFP ne comporte pas de séquence d'adressage nucléaire, et la localisation nucléaire de la mitogaligine est également observable dans une fusion DsRed-MG-GFP (résultat non montré), ce qui confirme que les éléments déterminants de l'adressage nucléaire sont portés par la mitogaligine.

L'adressage de la mitogaligine vers le noyau met probablement en jeu des mécanismes de transport actif puisque la protéine est concentrée dans le noyau, et en ressort lorsque la synthèse d'ATP est inhibée (Gonzalez, Thèse 2007). Alternativement, ce résultat pourrait indiquer que la rétention de la mitogaligine dans le noyau nécessite de l'ATP. Il serait alors intéressant de connaître les interactions de la mitogaligine avec des protéines nucléaires.

 La mitogaligine : une protéine contenant deux signaux de localisations intracellulaires différentes

La mitogaligine possède donc deux signaux d'adressage : l'un nucléaire et l'autre mitochondrial (MLS).

Ceci n'est pas une exception. De nombreuses protéines impliquées dans l'apoptose possèdent ces deux types de signaux. Citons le cas de protéines pro-apoptotiques : VP22 (Zhu *et al*, 2005), *Apoptosis Inducing Factor* AIF (Daugas *et al*, 2000), p53 (Sansome *et al*, 2001) et de protéines anti-apoptotiques : *p21-activated kinase 5* (Cotteret et Chernoff, 2006).

Les mécanismes de régulation qui font que l'un ou l'autre des signaux est reconnu, sont très peu connus. Est-ce un changement de conformation de la protéine qui laisse apparaître l'un ou l'autre des signaux ?

Dans le cas de l'AIF, la protéine est synthétisée et transloquée vers la mitochondrie. Puis, suite à l'émission d'un signal pro-apoptotique, l'AIF est dirigée vers le noyau où elle participe à la dégradation de l'ADN (Daugas *et al*, 2000). Cette protéine a donc plusieurs fonctions dont on ignore le mode de régulation. Dans un tel modèle, la mitogaligine se rapprocherait de l'AIF : dans la situation où la mitogaligine est native, le signal mitochondrial est d'abord reconnu (ou reconnu plus efficacement que le signal nucléaire). Celle-ci est alors adressée à la mitochondrie puis un facteur apoptotique, qui reste à déterminer, provoque sa délocalisation dans le cytoplasme pour être ensuite dirigée vers le noyau où elle déclencherait la mort cellulaire.

La protéine p53 est un autre exemple caractéristique du trafic nucléo-mitochondrial suite à un stimulus apoptotique (Sansome *et al*, 2001). Dans les mitochondries, p53 agit comme une protéine pro-apoptotique à domaine BH3-seulement : elle conduit à l'oligomérisation de Bak, la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale puis au relargage de cytochrome c (Mihara *et al*, 2003).

La mitogaligine présente également des similarités fonctionnelles avec la protéine smARF (*Small mitochondrial ARF protein*). Dans les mitochondries, smARF induit la dépolarisation de la membrane externe mitochondriale puis la mort cellulaire (Reef *et al*, 2006a ; Reef *et al*, 2006b). Plus récemment, Ueda *et al*, ont montré que cette protéine peut être adressée au nucléoplasme lorsqu'elle est fusionnée à son extrémité N-terminale à l'EGFP où elle induit l'apoptose via l'activation de la p53 (Ueda *et al*, 2008).

Les perspectives de ce travail sont multiples. Le trafic intracellulaire de la mitogaligine pourrait être étudié par des techniques d'immunofluorescence, permettant de suivre la domiciliation de la protéine native, non fusionnée à l'EGFP. Les mutants de localisation nucléaire de la mitogaligine construits ont été étudiés dans un contexte d'adressage de la protéine et non dans un contexte de cytotoxicité. La forme nucléaire de la mitogaligine induit des caractéristiques propre de l'apoptose, à savoir l'activation de la caspase-3, une dégradation de l'ADN, et l'induction de la voie intrinsèque mitochondriale apoptotique par relocalisation de Bax aux mitochondries et relargage de cytochrome c (Gonzalez *et al*, 2009) (Article chapitre 1 partie I). L'expression nucléaire de la mitogaligine induit une cytotoxicité

plus importante que la mitogaligine mitochondriale. Nous pourrions alors étudier la cytotoxicité de la mitogaligine nucléaire *via* l'utilisation des mutants construits. D'autre part, il serait intéressant de savoir quels facteurs (apoptotiques ou non) permettent de diriger la mitogaligine vers le noyau et si l'apoptose induite par la mitogaligine nucléaire s'effectue par activation de p53.

Conclusion

Nous avons identifié un nouveau type de signal de localisation nucléaire non conventionnel. Cet adressage nucléaire est basé sur la répétition de séquences répétitives modulables. Cette structure pourrait expliquer le fait que le signal de localisation mitochondriale soit reconnu avant le signal nucléaire. Il est admis que le MLS des protéines est reconnu pendant la traduction (Mueller *et al*, 2004). Le MLS de la mitogaligine doit donc être reconnu avant la traduction du long signal d'adressage nucléaire de la protéine. Au noyau, l'apoptose induite par la mitogaligine implique la translocation mitochondriale de Bax, le relargage de cytochrome c dans le cytosol, l'activation de la caspase-3, et la fragmentation de l'ADN. Cette mort est donc différente de celle induite par la mitogaligine mitochondriale, qui est assimilable à une voie alternative de la mort cellulaire programmée (indépendante de la caspase-3 et ADN non fragmenté). Il est difficile à l'heure actuelle de savoir si ces 2 voies de signalisation sont impliquées dans des interactions fonctionnelles de régulation du processus apoptotique ou si elles sont indépendantes l'une de l'autre.

Partie II :

Etude des modifications post-traductionnelles potentielles de la mitogaligine par mutagénèse dirigée

Introduction

Les modifications post-traductionnelles sont souvent importantes dans la régulation de l'activité des molécules de l'apoptose (Hübner *et al*, 2008). De même, la localisation des protéines est un élément critique dans la régulation de la mort cellulaire programmée (Lindenboim *et al*, 2009) : les protéines peuvent exercer des fonctions différentes selon leur localisation. Tel est le cas des protéines apoptotiques AIF, cytochrome c ou encore Bad (Gurbuxani *et al*, 2003 ; Yang *et al*, 1997 ; Danial *et al*, 2009). La redistribution protéique d'un compartiment à un autre est souvent la conséquence de modifications post-traductionnelles (Reinders et Sickmann, 2007). Nous avons montré que la mitogaligine possède une double localisation cellulaire. Elle est principalement observée associée aux mitochondries, et peut aussi enclencher l'apoptose lorsqu'elle est nucléaire. Nous nous sommes alors intéressés à savoir si des événements post-traductionnels pourraient être impliqués dans la régulation de la localisation de la mitogaligine. De telles modifications s'inscrivent généralement dans des sites consensus spécifiques. Nous avons donc utilisé, comme stratégie de départ classique, la prédiction bioinformatique (Sinhaikul *et al*, 2008). Le serveur web de prédiction le plus utilisé est l'Expert du Système d'Analyse Protéique **ExPASy** (<http://www.expasy.org>). Le tableau 4 regroupe les différents logiciels utilisés pour prédire les sites potentiellement modifiés de la mitogaligine.

Tableau 4 : Sites de modifications post-traductionnelles de la mitogaligine prédits par bioinformatique

Modifications post-traductionnelles étudiées	Logiciels de prédiction	Sites prédits
Sumoylation/ ubiquitylation	SUMOplot	K75
Phosphorylation	Netphosk 1.0, Netphosk 2.0, Disphos, Motif Scan	T29, S34, T38, S39, S52, S57, T62, T73, S79

Puis, par une approche de mutagenèse dirigée, nous avons étudié les conséquences des remplacements des cystéines de la mitogaligine. Les cystéines, par le biais d'établissement ou de clivage de ponts disulfures, sont souvent responsables des changements structuraux d'une protéine nécessaire pour sa maturation (Simizu *et al*, 2007 ; Hogg, 2003). Toutefois, en ce qui concerne la mitogaligine, les mutations des cystéines n'affectent ni sa localisation mitochondriale ni sa localisation nucléaire.

D'autre part, nous avons étudié, par mutagenèse dirigée, l'effet de mutations de sites potentiels de sumoylation/ubiquitylation et de phosphorylation sur la mitogaligine. Les résultats obtenus montrent que certaines de ces modifications post-traductionnelles pourraient être importantes. En particulier, la phosphorylation pourrait être une voie de régulation de la localisation de la mitogaligine. Elle pourrait également intervenir dans la régulation d'un processus de protéolyse de la mitogaligine et serait donc impliquée dans la stabilité de la protéine.

Matériels et méthodes

1- Construction des plasmides

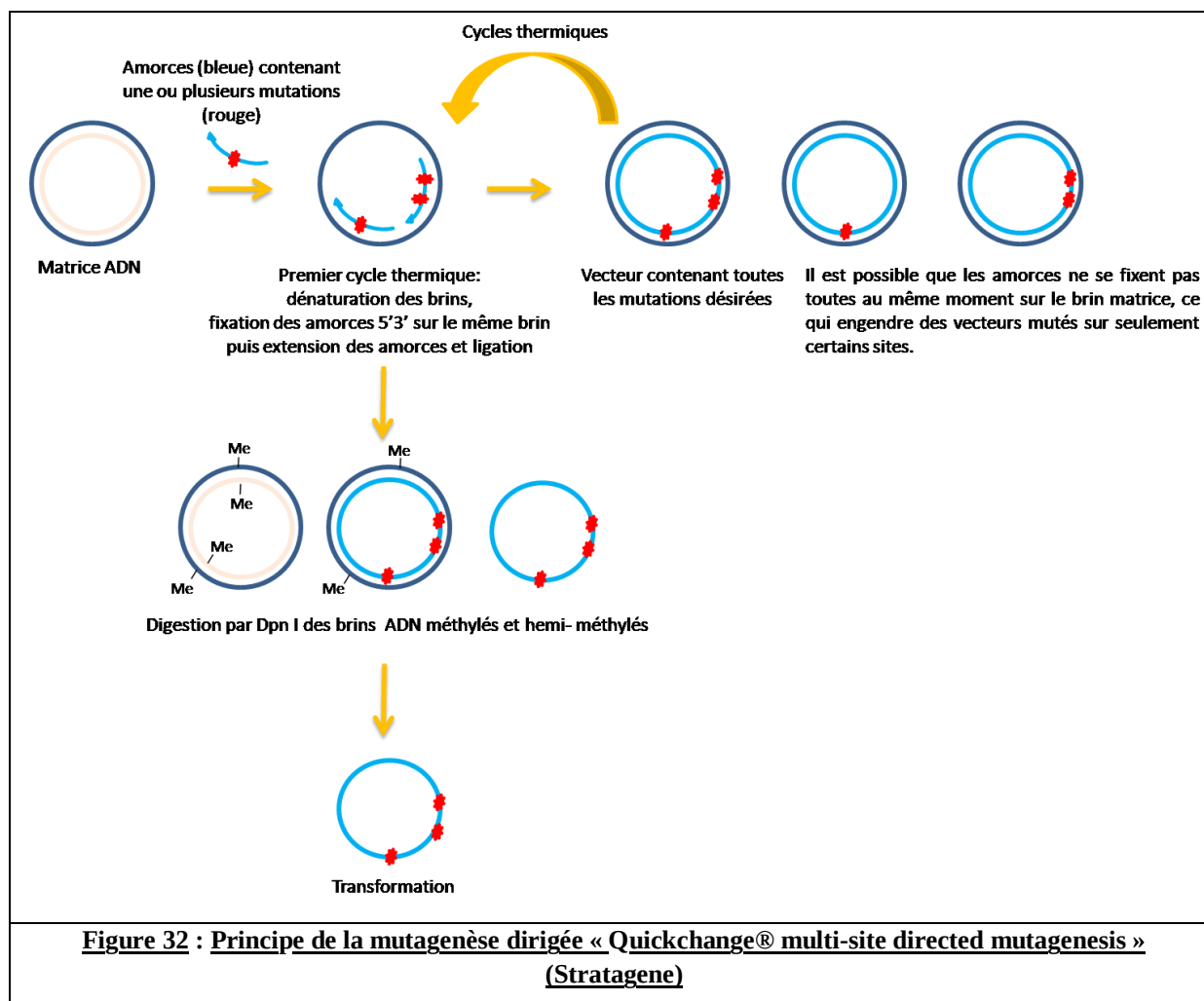
L'ensemble des vecteurs utilisés dans cette étude ont été construits par mutagenèse dirigée avec le kit « Quickchange® multi-site directed mutagenesis » (Stratagene) selon les recommandations du fournisseur (Tableau 5).

Tableau 5 : Amorces contenant les sites mutés pour la mutagenèse dirigée des vecteurs étudiés dans les modifications post-traductionnelles potentielles (MPT) de la mitogaligine

MG= mitogaligine

MPT et protéine visées	Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce 5'3'	Sites mutés	Matrice
Phosphorylation MG	Ammit-pho1TA	ctacccggggcaggcGCCccaggggc	T29A	pMG-EGFP-CG
Phosphorylation MG	Ammit-pho2TA	tggacaggcGCCGCCaggcgctaccctgg	T38A et S39A	
Phosphorylation MG	Ammit-pho3TA	ctacccaggggcGCCcaggccctgg	T62A	
Phosphorylation MG	Ammit-pho4TA	cccatcttctggGACgccaagtgccaccgg	T73A	
Phosphorylation MG	Ammit-pho1TD	ccccggggcaggcGACccaggggc	T29D	
Phosphorylation MG	Ammit-pho2TD	ctggacaggcGACGACaggcgctaccctgagc	T38D et S39D	
Phosphorylation MG	Ammit-pho3TD	ctacccaggggcGACcaggccctggggc	T62D	
Phosphorylation MG	Ammit-pho4TD	cccatcttctggGACgccaagtgccaccggagc	T73D	
Phosphorylation MG	S34D	ccccaggggcttaGACtggacagcacctcc	S34D	
Phosphorylation MG	S39D	cctggacaggcaccGACaggcgctaccctgg	S39D	
Phosphorylation MG	S52D	g agc tta tcc cgg GAC acc tgc acc tgg	S52D	
Phosphorylation MG	S57D	gcacctgcacctggGACctaccaggggcacc	S57D	
Phosphorylation MG	S79D	gccaagtgtccccggGACctaccctgccactgg	S79D	
Phosphorylation MG	T36D	ggggcttatcttggGACggcacctccaggcgc	T36D	
Phosphorylation MG	T38D	cctggacaggcGACtccaggcgctacc	T38D	
Sumoylation/ Ubiquitylation MG	MGKR-F	acagccCGTtggaccggagcctaccctgc	K75R	pMG-EGFP-CG pEGFP-MG
Etude des Cystéines	Mutcys-LS1	ggggaaccagccAGCtggggcaggggg	C10S	pMG-EGFP-CG pEGFP-MG
	Mutcys-LS2	tccggagcaccAGCacctggagtc	C54S	
	Mutcys-LS3	tggacagccaagAGCccccggagcc	C76S	
	Mutcys-LS4	cggagcctaccAGCactggcccc	C82S	
	Mutcys-LS5	ctatggcgccccAGCtgggacctg	C90S	
	Mutcys-LS6	tggccactgatAGTgccttaggatcc	C95S	

Le principe est décrit dans la Figure 32.



La réaction est réalisée dans un appareil à cycles thermiques programmables (iCycler Thermal Cycler, Biorad, USA), et se déroule comme suit : 1 minute de dénaturation préalable à 95°C, suivie de 30 cycles composés de 1 minute de dénaturation à 95°C, 1 minute d'hybridation des amorces à 55°C, 10 minutes d'élongation à 65°C puis 10 minutes d'extension finale à 65°C.

Les produits sont ensuite digérés par 10 unités de Dpn1 à 37°C pendant 1 h pour dégrader l'ADN de la matrice.

2- Amplification et purification des plasmides mutés

Transformation bactérienne

La transformation bactérienne est réalisée dans des bactéries compétentes « XL10-Gold » comme le préconise le fournisseur (Stratagene).

Extraction et vérification de la taille des ADN plasmidiques

Les colonies bactériennes obtenues après transformation et amplification sont testées par la technique de la lyse alcaline, encore appelée « minipreps » (Birnboim et Doly, 1979).

Après centrifugation d'un ml de culture, le culot bactérien est repris dans 100 µl d'une solution isotonique (50 mM de glucose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA pH 8). Après 5 minutes à 4°C, 200 µl d'une solution composée de SDS 1% (Sodium Dodecyl Sulfate) et de NaOH 0,2 N sont ajoutés. La solution est homogénéisée par retournement du tube puis placée dans la glace 5 minutes. Cent cinquante microlitres d'une solution composée de 3 M d'acétate de potassium sont ajoutés: le plasmide renaturé, reste en solution. Après 2 à 5 minutes dans la glace et centrifugation, le surnageant est transféré dans un autre tube, auquel 1 ml d'éthanol 100% froid est ajouté. Les tubes sont placés dans la glace et centrifugés 5 minutes. Le culot est solubilisé par addition de 500 µl de TBS-EDTA (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7,4, EDTA 10 mM). Un ml d'éthanol froid est ajouté. Après 2 à 5 minutes dans la glace, une nouvelle centrifugation est réalisée et le surnageant est totalement éliminé. Le précipité est séché.

Cinquante microlitres de TE + RNase (100 µg/ml) sont ajoutés sur le culot et incubés 10 minutes à 37°C.

Vérification de la taille des plasmides

La taille des plasmides obtenus à l'issue des mini-préparations est ensuite vérifiée par gels d'électrophorèse analytique. Les plasmides sont également vérifiés sur gel d'agarose après digestions enzymatiques.

Amplification et extraction des plasmides pour le séquençage

Cinq microlitres des souches sélectionnées pour être susceptible de contenir la ou les mutation(s) voulue(s) sont incubés dans 5 ml de milieu LB en présence de kanamycine (50 µg/ml) pendant 1 nuit à 37°C sous agitation. L'extraction des ADN plasmidiques s'effectue grâce au kit Macherey-Nagel « MN Nucleospin Plasmid » selon les recommandations du fabricant.

Les ADN plasmidiques sont ensuite dosés par spectroscopie (Nanodrop) par lecture de l'absorbance à 260 nm. Un µg d'ADN est envoyé au séquençage (MWG-Biotech AG). La séquence obtenue est alignée avec la séquence théorique grâce au logiciel MegAlign 7.

Résultats du séquençage

- Construction des vecteurs mutés sur les nucléotides des thréonines et sérines de la mitogaligine

L'objectif initial était de construire un vecteur muté sur les Thr 29, Thr 38, Ser 39, Thr 62 et Thr 73. Nous avons vu dans le principe de la mutagenèse dirigée multiple, que nous pouvions obtenir des formes intermédiaires de vecteurs. C'est ainsi que nous avons obtenu un vecteur codant la mitogaligine mutée sur les Thr 29, Thr 38, Ser 39 et Thr 73, ainsi qu'un vecteur codant une mitogaligine mutée sur les Thr 29 et Thr 62.

- Construction des vecteurs mutés sur nucléotides correspondant aux cystéines de la mitogaligine

L'objectif était de construire un vecteur muté sur les 6 cystéines de la mitogaligine. Un vecteur muté sur les cystéines 54, 82, 90 et 95 a été construit par le système « Quick change multi-site directed mutagenesis » (pMG^{4CS}-EGFP). Les mutations sur les 2 dernières cystéines (10 et 76) ont été introduites, par le même système, par différentes PCR successives, donnant

naissance à des plasmides mutés sur 5 cystéines (Tableau 16) soit pMG-^{5CS}EGFP et pMG-^{5CS2}EGFP.

Purification des vecteurs

Suite au séquençage, les plasmides sont amplifiés. Pour cela, on isole d'abord sur du LB-agar + kanamycine (50 µg/ml), les colonies issues des plasmides sélectionnés. A partir d'une des colonies isolées, on établit une pré-culture dans 2 ml de milieu LB + kanamycine à 37°C pendant 8h. Cette pré-culture est ensuiteensemencée dans 150 ml de milieu LB + kanamycine et agitée à 37°C sur la nuit.

L'extraction s'effectue ensuite grâce au kit d'extraction « Nucléo Bond 500PC » selon les recommandations du fabricant (Macherey-Nagel).

3- Transfection transitoire des cellules HeLa

Les cellules HeLa (ATCC, CCL2) sont cultivées à 37°C sous atmosphère humide enrichie à 5% en CO₂ dans du milieu MEM contenant 2 mM de L-alanylglutamine et complété avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et 100 unités/ml de pénicilline-streptomycine. Les cellules sont distribuées la veille d'une transfection dans une plaque de 6 ou 12 puits, en fonction de l'utilisation ultérieure des cellules transfectées (Tableau 6) et incubées 24 heures à 37°C dans l'étuve enrichie à 5% de CO₂.

Peu avant la transfection, le milieu MEM est aspiré des puits, et remplacé par du milieu DMEM 1X sans SVF ni antibiotique. La transfection est réalisée avec du PEI (PolyEthylenImine) : 4,5 µl de PEI 10 µM pour 1 µg d'ADN en solution dans du sérum physiologique. Le complexe ADN-PEI est déposé dans des puits en culture et laissé 2 heures à 37°C. Le milieu est changé par un milieu de culture complet avec SVF et antibiotiques.

Tableau 6 : Caractéristiques des transfections

Caractéristiques	Immunofluorescence et microscopie de fluorescence	Western-blot
Nombre de cellules mises en plaque	8.10 ⁴ cellules/ puits	2.10 ⁵ cellules/ puits
Nature de la plaque (<i>Techno Plastic Products, 92006</i>)	12 puits avec lamelles	6 puits
Quantité d'ADN transfecté	2 µg	4 µg
Volume DMEM	0,5 ml	1 ml
Volume MEM	1 ml	2 ml

4- Immunofluorescence

Les cellules sont ensuite immunomarquées, 24 heures après transfection, selon le protocole suivant :

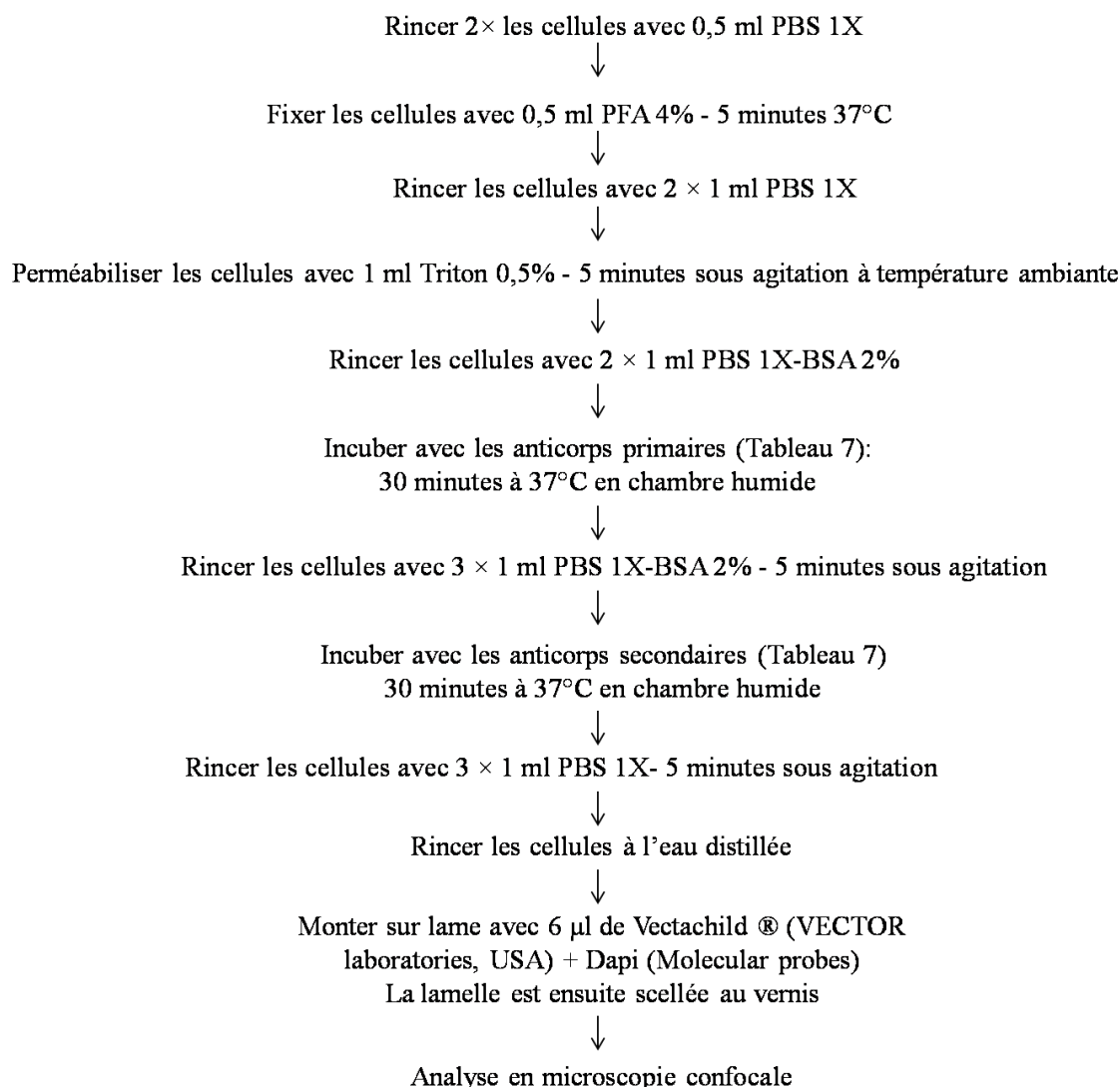


Tableau 7 : Anticorps utilisés en immunofluorescence pour l'étude des modifications post-traductionnelles potentielles de la mitogaligine

L'anticorps anti-mitogaligine détecte la forme nucléaire mais pas mitochondriale de la protéine en immunofluorescence.

Nature de l'anticorps	Anticorps	Clone	Fournisseur	Dilution
PRIMAIRE	Anti-Smac/Diablo (souris)	Monoclonal	BD- ref 612244	1/ 100
	Anti-mitogaligine (lapin)	Polyclonal 5312	Eurogentec (Seraing, Belgique)	1/ 1000
SECONDAIRE	Anti-lapin-cyanine 3	Monoclonal	Amersham- ref PA43004	1/ 1 000
	Anti-souris-cyanine 5	Monoclonal	Zymed- ref 81-6516	1/ 100

Afin de vérifier la spécificité des marquages, nous avons évalué le bruit de fond des anticorps secondaires sur des cellules transfectées. En terme de contrôle isotypique, la spécificité de l'anticorps anti-mitogaline a été testée grâce à du sérum pré-immun sur des cellules transfectées.

5- Microscopie de fluorescence

Les cellules sont observées 24 à 48 heures après la transfection au microscope inversé de fluorescence Axiovert 200M Zeiss. Le microscope est équipé de jeux de filtres permettant la détection d'EGFP (excitation BP 450-490, émission BP 515-565 ref.#10 Zeiss). Le système de microscopie est couplé à une caméra permettant une acquisition grâce au logiciel AxioVision 3.1 (Carl Zeiss Vision GmbH, Munich-Hallbergmoos, Allemagne).

6- Microscopie confocale

Les cellules sont transfectées sur des lamelles. Elles sont ensuite fixées avec 4% de PFA, 24h après transfection puis montées sur lame. Elles peuvent ensuite être observées au microscope Axiovert 200M Zeiss, microscope qui est couplé au laser LSM 510 META. Ce système de microscopie confocale est également relié à une caméra pour permettre l'acquisition, acquisition qui se fait grâce au logiciel Zeiss LSM 510 META.

Le traitement des photos se fait ensuite par le logiciel LSM Image Browser (ZEISS).

7- Extraction protéique/ gel SDS-PAGE et Western-blot

Lyse des cellules à 4°C

Vingt-quatre heures après transfection et après vérification de la transfection par microscopie de fluorescence, les cellules sont rincées avec 500 µl de PBS 1X (NaCl 137mM, KCl 2.7mM, KH₂PO₄ 1.5mM, Na₂HPO₄ 8mM, pH 7,4). Cent µl d'une solution de lyse froide non dénaturante (210 mM mannitol, 70 mM sucrose, 10 mM Hepes, 1 mM EDTA, pH7,5) à laquelle est ajouté 1% d'inhibiteur de protéases (Sigma Aldrich, France) sont déposés dans le puits à lyser. Le lysat cellulaire est gratté au cône puis placé dans un tube Ependorff à 4°C pendant 30 min. Le lysat est ensuite centrifugé 10 min à 12000 rpm. Le surnageant est récupéré dans un tube Ependorff propre.

Dosage protéique

La concentration des protéines du surnageant est estimé par la méthode de Bradford selon les recommandations du fournisseur (Sigma Aldrich). Les échantillons sont ensuite repris dans une solution de charge (4% SDS, 100 mM Tris-HCl, 12% glycérol, 2% β-mercaptoéthanol, 0,01% bleu de bromophenol).

Dénaturation des protéines 5 min à 95°C

Gel SDS-PAGE

Les protéines (20 µg) sont séparées en fonction de leur poids moléculaire sur un gel polyacrylamide dénaturant 12 % (protéines > 20 kDa) ou 15% (protéines < 20 kDa) (Mini Protean III, Biorad).

Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose selon les recommandations du fournisseur (Hybond-C Extra 0,45 µm, GE Healthcare) pendant 30 min (protéines < 20 kDa) à 1h (protéines > 20 kDa) sous ampérage constant 0,8 mA/cm². La technique de transfert utilisée est le transfert « semi-sec ». Suite au transfert, la membrane de nitrocellulose est incubée 1 heure à température ambiante ou la nuit à 4°C dans une solution « bloquante » à 2% (ECL Advance Western Blotting Détection Kit, GE Healthcare) ou dans une solution à 5% en lait écrémé dans du TBS-Tween 0,1%. Le gel polyacrylamide est, quant à lui, coloré 20 minutes au bleu de Coomassie G250 puis décoloré dans l'eau bouillante.

Western-blot

L'immunodétection des protéines se fait à l'aide des anticorps indiqués dans le Tableau 8. La membrane est incubée avec un anticorps primaire dilué dans une solution bloquante (GE Healthcare 2% ou lait écrémé 5% dans du TBS-Tween 0,1%) pendant 1 heure à température ambiante. La membrane est ensuite rincée dans des bains successifs de TBS-Tween 0.1% (1×15 min puis 3×5 min) puis la membrane est à nouveau incubée 45 min à température ambiante avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase (HorseRadish Peroxydase) dilué également dans la solution bloquante. La membrane est lavée dans des bains de TBS-Tween comme décrit précédemment et selon les recommandations du fabricant.

En chambre noire, la membrane est révélée à l'aide du kit *ECL advanced Western Blotting Détection* (GE Healthcare), selon les recommandations du fabricant, sur des films auto-radiographiques (Hyperfilm ECL, GE Healthcare).

Tableau 8 : Anticorps utilisés en western-blot pour l'étude des modifications post-traductionnelles potentielles de la mitogaligine

Nature de l'anticorps	Anticorps	Clone	Fournisseur	Dilution
PRIMAIRE	Anti-GFP (lapin)	Monoclonal	Abcam-ab290	1/ 50 000
	Anti-β-actine (souris)	Monoclonal-AC-15	Sigma-A1978	1/ 300 000
SECONDAIRE	Anti-lapin-Hrp	Polyclonal	Sigma-A6667	1/ 2 000 000
	Anti-souris-Hrp	Polyclonal	Proméga-A3682	1/ 500 000

8- Reproductibilité des résultats

Les expériences, que ce soient les transfections, l'analyse microscopique, l'immunofluorescence et l'analyse western-blot, ont été reproduits au moins 4 fois par plasmides. Les résultats présentés par la suite sont reproductibles et représentatifs de l'ensemble des résultats obtenus lors de ces différentes manipulations.

Résultats

Chapitre 1 : Protéolyse de la mitogaligine mitochondriale

Un anticorps polyclonal anti-mitogaligine a été développé au laboratoire. Des premières expériences indiquaient que cet anticorps, en immunofluorescence, révélait la mitogaligine uniquement si elle n'était pas associée aux mitochondries. Autrement dit, la forme nucléaire est détectée par l'anticorps mais pas la forme mitochondriale. Ce résultat, a priori surprenant laisse supposer que la protéine de fusion pourrait subir un clivage ou une dégradation de la mitogaligine dans la mitogaligine-EGFP. Nous avons donc, dans un premier temps, entrepris d'analyser par western-blot les formes nucléaire et mitochondriale de la mitogaligine.

 Protocole expérimental

Les cellules HeLa sont transfectées par les plasmides suivants :

Tableau 9 : Plasmides utilisés pour l'étude de la protéolyse de la mitogaligine

Nom des plasmides	Protéines codées
pEGFP	EGFP
pEGFP-MG	EGFP-mitogaligine
pMG-EGFP	mitogaligine-EGFP

Les cellules sont ensuite observées en microscopie de fluorescence pour vérifier la localisation attendue de la protéine de fusion, lysées puis analysées par western-blot avec un anticorps anti-GFP.

 Résultats

L'analyse par western-blot des lysats protéiques issus des transfections des cellules HeLa par pEGFP-MG révèle une protéine de fusion, détectée avec l'anticorps anti-GFP, à la taille attendue, c'est-à-dire 39 kDa. A l'inverse, le vecteur codant la forme mitochondriale de la mitogaligine, pMG-EGFP, révèle une protéine tronquée, détectée à une taille légèrement supérieure à celle de l'EGFP seule (Figure 33). La partie N-terminale de la protéine chimère est alors absente. Ainsi, la forme mitochondriale de la mitogaligine subit soit un clivage soit une dégradation rapide.

Partie II- Chapitre 1

Protéolyse de la mitogaligine

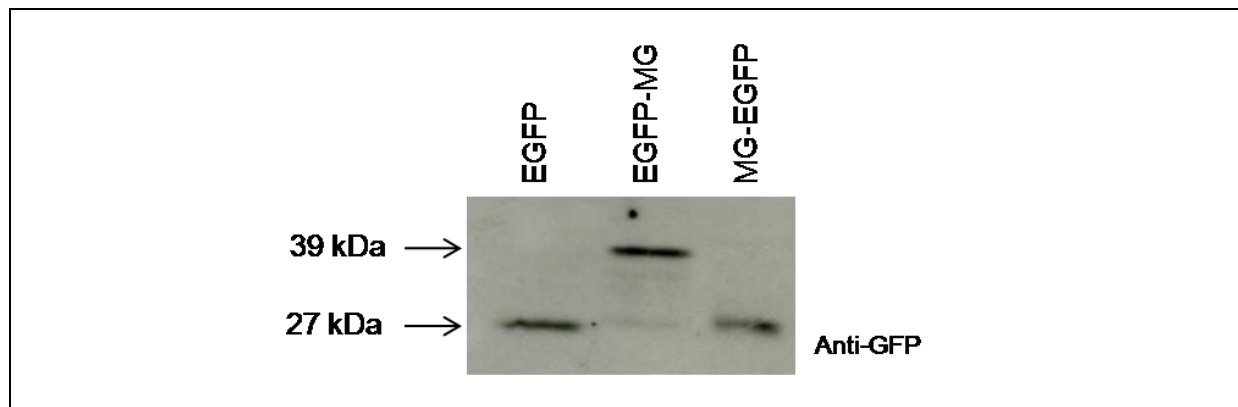


Figure 33 : La mitogaligine : une différence de taille en fonction de la localisation cellulaire

En fonction de la position de l'EGFP, la mitogaligine peut être nucléaire (EGFP en N-terminal) ou mitochondriale (EGFP en C-terminal) (partie I). L'analyse western-blot de ces 2 formes de la mitogaligine avec un anticorps anti-GFP révèle une forme nucléaire attendue de 39 kDa alors que la forme mitochondriale est tronquée, détectée à une taille légèrement supérieure à celle de l'EGFP seule.

Chapitre 2 : Mutagenèse dirigée du site potentiel de Sumoylation/Ubiquitinylation de la mitogaligine

La sumoylation et l'ubiquitinylation sont deux modifications post-traductionnelles régulées au niveau d'un même site, une lysine (Lee *et al*, 2006). La sumoylation et l'ubiquitinylation régulent, entre autre, le trafic intracellulaire des protéines ainsi que la stabilité protéique. De part ses différentes localisations et sa protéolyse mitochondriale, la mitogaligine pourrait être susceptible de subir ce genre de modifications post-traductionnelles. Dans un premier temps, nous avons analysé si le protéasome pouvait être impliqué dans la dégradation de la mitogaligine par utilisation d'un inhibiteur spécifique (Lee et Goldberg, 1998). Dans un second temps, par mutagenèse dirigée, nous avons testé le seul site potentiel de sumoylation/ubiquitinylation de la mitogaligine, à savoir la lysine 75. L'inhibition du protéasome conserve l'intégrité de la mitogaligine, suggérant ainsi un rôle important dans la dégradation de la protéine. En principe, les protéines sont envoyées à ce système de dégradation *via* une ubiquitinylation préalable sur une lysine. Nous verrons que la mutation de la seule lysine de la mitogaligine n'affecte pas sa dégradation malgré sa dépendance pour le protéasome.

I- L'inhibiteur spécifique du protéasome MG-132 atténue la protéolyse de la mitogaligine mitochondriale

 Protocole expérimental

Des cellules HeLa ont été transfectées par les plasmides suivant :

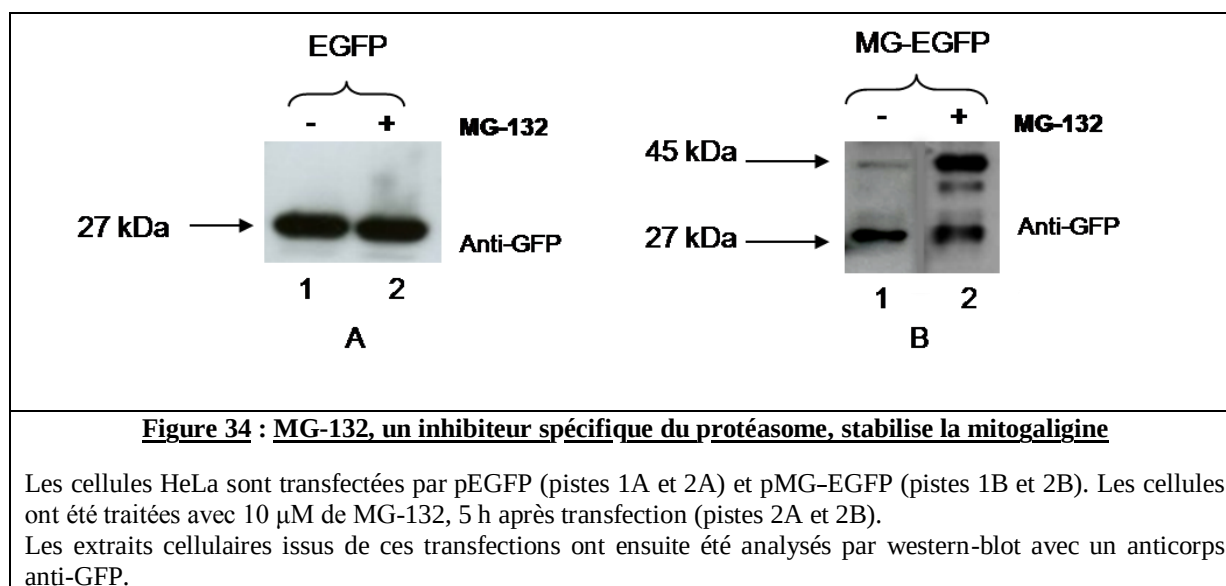
Tableau 10 : Plasmides utilisés pour l'étude de la protéolyse de la mitogaligine en présence de MG-132

Nom des plasmides	Protéines codées
pEGFP	EGFP
pEGFP-MG	EGFP-mitogaligine
pMG-EGFP	mitogaligine-EGFP

Cinq heures après transfection les cellules sont traitées ou non avec 10 μ M de MG-132 (C2211, Sigma), un inhibiteur spécifique du protéasome (Lee et Goldberg, 1998). Les transfections sont ensuite vérifiées par microscopie de fluorescence 24 h après transfection. Les cellules sont lysées, et les extraits cellulaires analysés par western-blot avec un anticorps anti-GFP.

+ Résultats

Les extraits cellulaires issus des cellules transfectées par pEGFP montrent une expression équivalente de la protéine EGFP, en présence ou non de l'inhibiteur du protéasome MG-132 (pistes 1 et 2 A Figure 34). La mitogaligine mitochondriale, soit MG-EGFP, est une protéine principalement détectée sous une forme tronquée dont la taille est légèrement supérieure à celle de l'EGFP seule (piste 1B), confirmant ainsi l'observation de la Figure 33. En présence de MG-132, il apparaît nettement une diminution de la protéolyse de la mitogaligine (piste 2B). De manière surprenante, la taille de la forme majoritaire non tronquée de la mitogaligine mitochondriale est légèrement supérieure à celle attendue : environ 45 kDa contre 39 kDa attendue.



+ Conclusion

La coupure/dégradation de la mitogaligine mitochondriale est diminuée en présence de l'inhibiteur spécifique du protéasome, le MG-132. Ceci suggère une possible intervention de l'ubiquitinylation dans ce système.

II- Mutagenèse dirigée du site potentiel de sumoylation/ubiquitinylation

+ Protocole expérimental

Dans le but de déterminer si la mitogaligine est régulée par sumoylation/ubiquitinylation, un vecteur codant pour la mitogaligine mutée sur son site potentiel de sumoylation/ubiquitinylation, à savoir la lysine 75 en arginine, a été construit. Ce vecteur et les témoins correspondants (Tableau 11) ont ensuite été transfectés dans des cellules HeLa. Ces dernières sont observées en microscopie de fluorescence et l'expression protéique analysée en western-blot avec un anticorps anti-GFP.

Partie II- Chapitre 2

Somoylation/ Ubiquitinylation potentielle de la mitogaligine

Tableau 11 : Vecteurs transfectés pour l'étude de la mutation du site potentiel de somoylation/ubiquitinylation de la mitogaligine

Nom des plasmides	Protéines codées	Sites mutés en Arg
pEGFP	EGFP	-
pMG-EGFP	mitogaligine-EGFP	-
pMG ^{K75R} -EGFP	mitogaligine-EGFP	Lys 75
pEGFP-MG	mitogaligine-EGFP	-
pEGFP-MG ^{K75R}	mitogaligine-EGFP	Lys 75

Résultats

La transfection de cellules HeLa par les vecteurs pMG-EGFP montre l'adressage mitochondrial attendu de la protéine de fusion (photo A Figure 35). La mutation du site potentiel de somoylation/ubiquitinylation de la mitogaligine, à savoir la lysine 75 en arginine n'altère pas la domiciliation mitochondriale de la protéine de fusion (photo B). La protéine de fusion EGFP-mitogaligine possède quant à elle, la localisation nucléaire attendue (photo C). L'expression de cette protéine chimère dont la lysine 75 a été mutée en arginine (K75R), conserve un adressage nucléaire (photo D).

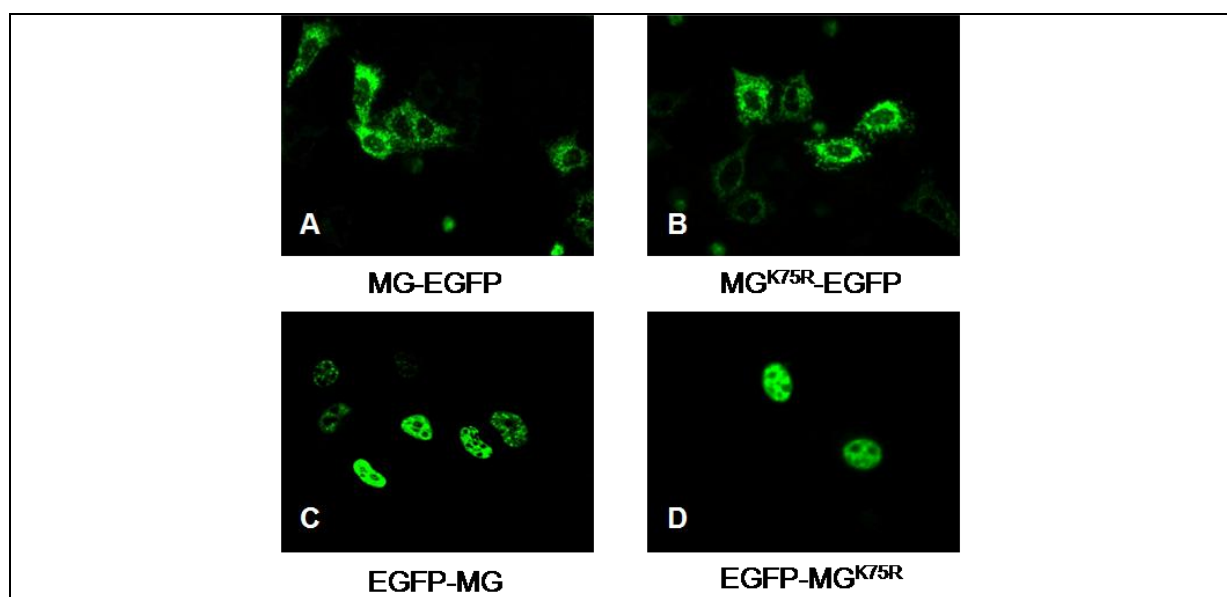


Figure 35 : Effet de la mutation du site potentiel de somoylation/ubiquitinylation sur la localisation de la mitogaligine

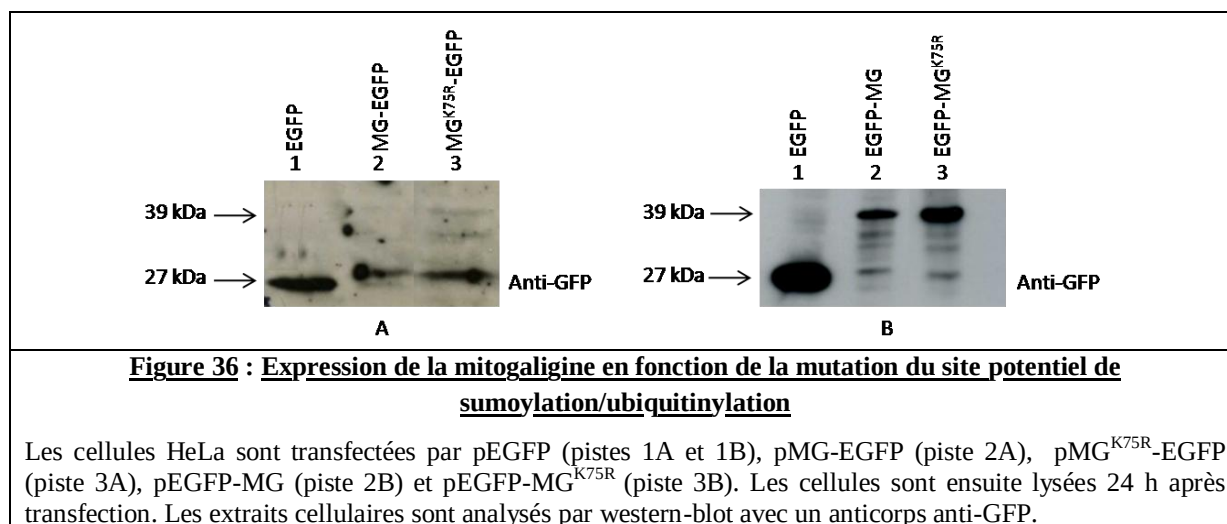
Les cellules HeLa sont transfectées par pMG-EGFP (A), pMG^{K75R}-EGFP (B), pEGFP-MG (C), pEGFP-MG^{K75R} (D). Les cellules sont observées en microscopie de fluorescence 24 h après transfection. Grossissement $\times 320$

Les pistes 1 (Figure 36 A et B) sont un contrôle permettant de détecter l'expression de l'EGFP à la taille de 27 kDa. La piste 2A représente la mitogaligine-EGFP. Cette protéine de fusion est, comme attendue, tronquée, avec une taille légèrement supérieure à celle de l'EGFP

Partie II- Chapitre 2

Somoylation/ Ubiquitinylation potentielle de la mitogaligine

seule. L'extrait protéique, issu de la transfection du vecteur contenant la mutation de la lysine 75 en arginine de la mitogaligine, révèle également une mitogaligine-EGFP tronquée (piste 3A). La forme nucléaire de la protéine, soit EGFP-mitogaligine est présente majoritairement à une taille de 39 kDa, comme attendu (piste 2B). On détecte également des produits de dégradation de cette protéine de fusion. De la même manière, la mutation de la lysine 75 en arginine de la mitogaligine fusionnée en N-terminale à l'EGFP ne modifie pas le profil électrophorétique de la protéine de fusion (piste 3B).



Conclusion

La protéolyse de la mitogaligine mitochondriale est nettement diminuée en présence de MG-132, un inhibiteur spécifique du protéasome (Figure 34). Cependant, la mutation de la lysine 75 n'a pas de conséquence apparente sur la localisation ou la taille de la protéine de fusion mutée, que la mitogaligine soit mitochondriale ou nucléaire. Les protéines sont, la plupart du temps, adressées à ce système de dégradation protéique *via* une ubiquitinylation. Cette dernière a généralement lieu sur les lysines des protéines. Malgré la mutation de la Lys 75 en Arg, la mitogaligine mitochondriale reste tronquée. La lysine 75 testée n'a pas de rôle apparent dans une éventuelle sumoylation ou ubiquitinylation de la mitogaligine mitochondriale. La mitogaligine ne possède qu'une seule lysine dans sa séquence primaire, ce qui nous amène à émettre l'hypothèse que sa dégradation soit dépendante du protéasome mais indépendante d'une ubiquitinylation. Par ailleurs, l'ubiquitinylation des protéines reste possible sur des résidus autres que des lysines, comme par exemple des cystéines, des sérines et thréonines (Tait *et al*, 2007). Un de ces acides aminés pourrait alors être responsable de la protéolyse de la mitogaligine.

Partie II- Chapitre 3

Phosphorylation potentielle de la mitogaligine

Chapitre 3 : Sites potentiels de phosphorylation de la mitogaligine

La phosphorylation des protéines est la modification post-traductionnelle la plus fréquente. La prédiction bioinformatique de sites de phosphorylations potentiels de la mitogaligine a révélé plusieurs sites, répertoriés dans le tableau 12.

Tableau 12 : Sites potentiels de phosphorylation de la mitogaligine prédits par programmes bioinformatiques

Le score indique la probabilité de phosphorylation du résidu.

T/S	Kinases	Serveur	Score
T29		DISPHOS	0.941
	PKC, CaMK-II	Predphospho	
S34	Akt (PKB), PKA	Motif Scan	0.58
	CaMK-II	Motif Scan	0.606
	14-3-3	Motif Scan	0.504
	PKA	NetPhosk1.0	0.68
		NetPhosk2.0	0.973
T38	PKC	Motif Scan	0.508
		NetPhosk2.0	0.88
	CaMK-II	NetPhosk1.0	0.46
S39	Cdc2 (Cdk1)	NetPhosk1.0	0.51
	PKC	NetPhosk1.0	0.47
S52	Clk2	Motif Scan	0.854
S57	Akt (PKB)	Motif Scan	0.693
	14-3-3	Motif Scan	0.566
	PKC	Motif Scan	0.5
	Cdc2, PKC	NetPhosk1.0	0.5
T62		NetPhos2.0	0.964
	DNAPK	NetPhosk1.0	0.54
T73	PKC	NetPhosk1.0	0.6
	CaMK-II	Motif Scan	0.47
S79	GSK3	NetPhosk1.0	0.47

A partir de ces prédictions, des vecteurs codant des formes mutées de la mitogaligine sur ces sites potentiels de phosphorylation ont été construits par mutagénèse dirigée et testés (partie II, matériels et méthodes). Les sites potentiels de phosphorylation (Thr et Ser) de la mitogaligine ont été mutés soit en Asp soit en Ala. Dans le premier cas, la mutation est alors qualifiée de phospho-mimétique, alors que dans le second cas, elle empêche une éventuelle phosphorylation (Du *et al*, 2009).

I- La phosphorylation : une modification post-traductionnelle envisageable dans la régulation de l'activité de la mitogaligine.

I.1- Détermination des résidus impliqués dans une phosphorylation potentielle

** Protocole expérimental**

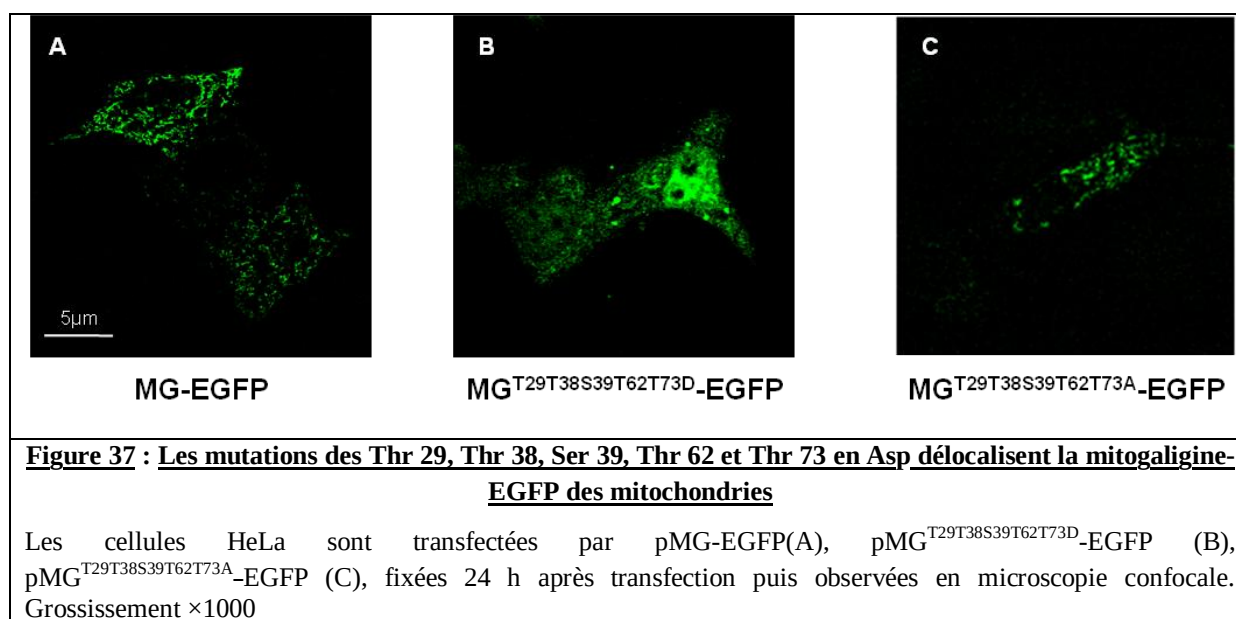
Des cellules HeLa ont été transfectées par les plasmides suivants puis fixées sur lame et observées, 24 h après transfection, en microscopie confocale.

Tableau 13 : Plasmides construits pour l'étude de la phosphorylation potentielle de la mitogaligine

Nom des plasmides	Protéines codées	Sites mutés
pEGFP	EGFP	-
pMG-EGFP	mitogaligine-EGFP	-
pMG ^{T29T38S39T62T73D} -EGFP	mitogaligine-EGFP	Thr 29, Thr 38, Ser 39, Thr 62 et Thr 73 en Asp
pMG ^{T29T38S39T62T73A} -EGFP	mitogaligine-EGFP	Thr 29, Thr 38, Ser 39, Thr 62 et Thr 73 en Ala

** Résultats**

Alors que la mitogaligine-EGFP possède une localisation mitochondriale (photo A Figure 37), les mutations des Thr 29, Thr 38, Ser 39, Thr 62 et Thr 73 en aspartate entraînent une délocalisation de la protéine chimère hors des mitochondries. En particulier, on trouve beaucoup plus de cellules avec un noyau positif (photo B). Au contraire, la mitogaligine mutée sur ces mêmes Thr/Ser en alanine conserve un adressage mitochondrial (photo C).



I.2- Détermination des résidus impliqués dans la délocalisation de la mitogaligine

Protocole expérimental

Afin de déterminer les acides aminés impliqués dans cette délocalisation, les résidus Ser et Thr de la mitogaligine ont été mutés individuellement par mutagenèse dirigée. Les cellules HeLa ont ensuite été transfectées par les plasmides construits (tableau 14).

Tableau 14 : Plasmides construits pour étudier les résidus impliqués dans la délocalisation de la mitogaligine

Nom des plasmides	Protéines codées	Sites mutés
pEGFP	EGFP	-
pMG-EGFP	mitogaligine-EGFP	-
pMG ^{T29D} -EGFP	mitogaligine-EGFP	Thr 29 en Asp
pMG ^{T38D} -EGFP	mitogaligine-EGFP	Thr 38 en Asp
pMG ^{S39D} -EGFP	mitogaligine-EGFP	Ser 39 en Asp
pMG ^{T73D} -EGFP	mitogaligine-EGFP	Thr 73 en Asp
pMG ^{T38S39D} -EGFP	mitogaligine-EGFP	Thr 38 et Ser 39 en Asp
pMG ^{T38S39A} -EGFP	mitogaligine-EGFP	Thr 38 et Ser 39 en Ala
pMG ^{T29T73D} -EGFP	mitogaligine-EGFP	Thr 29 et Thr 73 en Asp
pMG ^{T29T73A} -EGFP	mitogaligine-EGFP	Thr 29 et Thr 73 en Ala
pMG ^{T29T38S39T73D} -EGFP	mitogaligine-EGFP	Thr 29, Thr 38, Ser 39 et Thr 73 en Asp
pMG ^{T29T38S39T73A} -EGFP	mitogaligine-EGFP	Thr 29, Thr 38, Ser 39 et Thr 73 en Ala

Les cellules ont été observées par microscopie de fluorescence et confocale après immuno-histochimie (Figures 38 et 40). Les cellules ont été marquées avec les anticorps anti-mitogaligine (MG) et anti-Smac/Diablo (Smac/Diablo).

Des extraits cellulaires issus d'une transfection similaire ont été testés en western-blot. La mitogaligine-EGFP a été révélée avec l'anticorps anti-GFP.

Résultats

- Résidus Thr 38 et Ser 39

La localisation de la fluorescence associée à la mitogaligine-EGFP sauvage est essentiellement mitochondriale, avec quelques noyaux positifs (ligne A colonne EGFP Figure 38). Comme mentionné auparavant, l'anticorps anti-mitogaligine, ne reconnaît que la forme nucléaire de la protéine (ligne A colonne MG Figure 38). Smac/Diablo est une protéine mitochondriale utilisée comme marqueur des mitochondries. La co-localisation entre la mitogaligine-EGFP et Smac/Diablo permet d'affirmer son adressage mitochondrial. L'observation en microscopie confocale de la mitogaligine^{T29T38S39T73D}-EGFP confirme la délocalisation des mitochondries observée précédemment en microscopie de fluorescence

(ligne B Figure 38). Ceci indique que l'effet de délocalisation n'est pas lié à la mutation de la Thr 62 en Asp. La fluorescence associée à la mitogaligine mutée sur les résidus Thr 29, Thr 38, Ser 39 et Thr 73 est intense dans le noyau, et de plus faible intensité dans le cytoplasme de la cellule, résultat confirmé avec l'anticorps anti-mitogaligine (ligne B colonne EGFP et MG). La protéine mutée sur les 4 Thr et Ser n'est pas co-localisée avec Smac/Diablo, ce qui laisse supposer qu'elle a perdu son adressage mitochondrial (ligne B colonne Smac/Diablo et superposition). Pour une vision plus nette de l'absence de co-localisation, ces photos sont agrandies dans la Figure 39 et Smac/Diablo a été marquée en rouge (ligne A Figure 39). Les mutations individuelles de la Thr 38, Ser 39 (lignes C et D Figure 38), ne suffisent pas en elles-mêmes pour induire une délocalisation des mitochondries de la mitogaligine-EGFP. Ces protéines mutées sur un seul résidu restent en effet mitochondriales, par superposition de l'EGFP détectée avec Smac/Diablo marquée. La mutation conjointe des sites potentiels de phosphorylation Thr 38 et Ser 39 en Asp est responsable de la perte de l'adressage mitochondrial (ligne E Figure 38). La mitogaligine^{T38S39D}-EGFP est présente dans le noyau et le cytoplasme des cellules transfectées. Tout comme pour la mitogaligine^{T28T38S39T73D}-EGFP, les photos de la mitogaligine^{T38S39D}-EGFP sont agrandies pour confirmer l'absence de co-localisation avec Smac/Diablo (Figure 39 B). Il est à noter que ces vecteurs ont également été mutés en Ala puis ont été testés dans les cellules HeLa. Les mutations en alanine ne modifient pas la domiciliation de la mitogaligine-EGFP (résultats non montrés).

Partie II- Chapitre 3

Phosphorylation potentielle de la mitogaligine

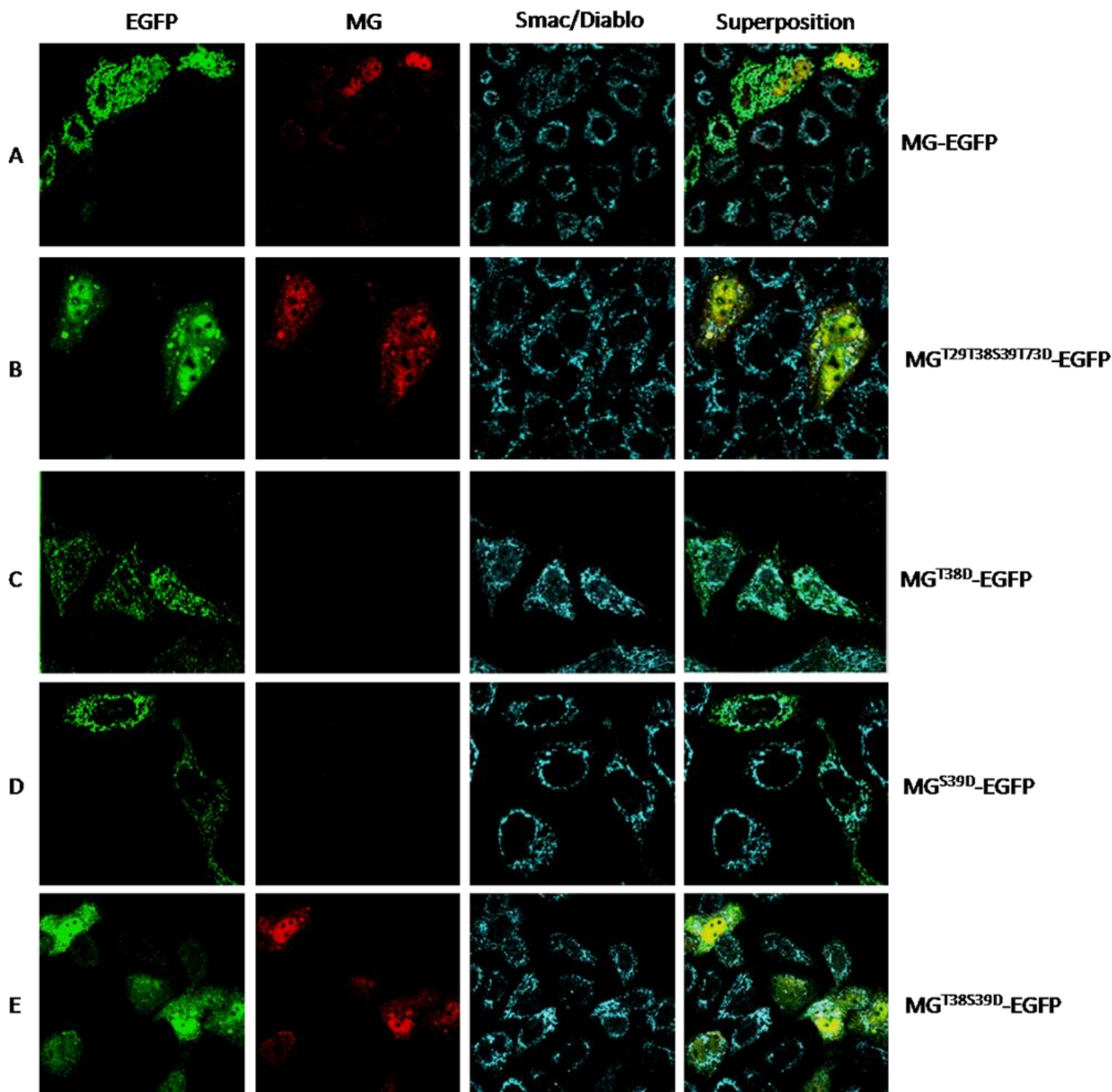
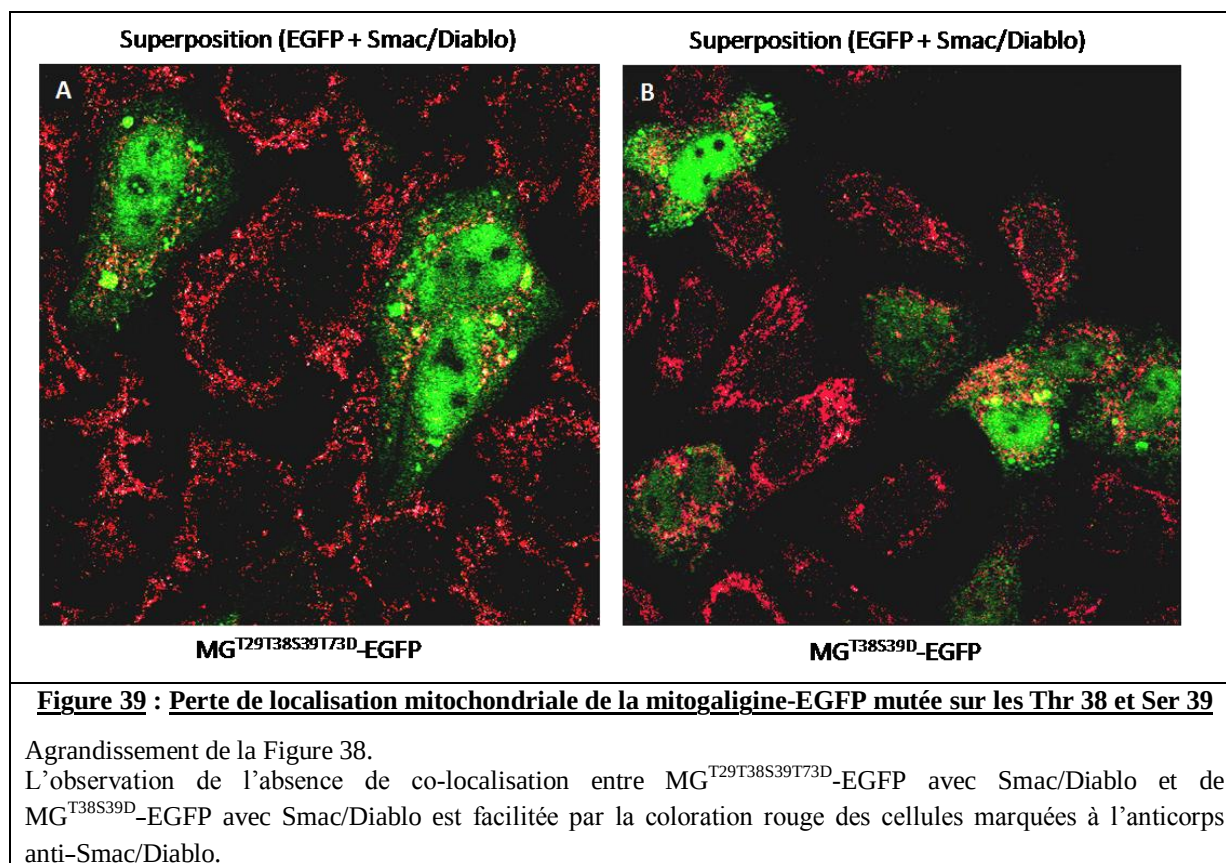


Figure 38 : La double mutation des Thr 38 et Ser 39 en Asp délocalise la mitogaligine-EGFP des mitochondries

Les cellules HeLa ont été transfectées par pMG-EGFP (A), pMG^{T29T38S39T73D}-EGFP (B), pMG^{T38D}-EGFP (C), pMG^{S39D}-EGFP (D), pMG^{T38S39D}-EGFP (E).

Les cellules ont été immuno-marquées, 24 h après transfection avec les anticorps anti-mitogaligine (MG) et anti-Smac/Diablo (Smac/Diablo), puis observées en microscopie confocale. Grossissement $\times 630$

L'anticorps anti-mitogaligine ne marque pas la mitogaligine mitochondriale.



- Résidus Thr 29 et Thr 73

A l'image des résultats précédents, les mutations individuelles des résidus Thr 29 et Thr 73 ne modifient pas la domiciliation mitochondriale de la mitogaligine (lignes B et C Figure 40). Après transfection des cellules par le vecteur pMG^{T29T73D}-EGFP, la mitogaligine codée, doublement mutée sur les Thr 29 et Thr 73 en Asp, conserve également une localisation mitochondriale (ligne D Figure 40). Par observation des cellules transfectées et du nombre de cellules transfectées mortes, on constate cependant une efficacité de transfection bien plus importante et une toxicité nettement diminuée lorsque les Thr 29 et Thr 73 sont mutées simultanément (Figure 41). Ces cellules présentent des mitochondries filiformes comparées aux mitochondries ponctiformes observées avec la protéine sauvage (visible sur la Figure 40 D). Ce constat confirme le caractère moins toxique de ce mutant. Ces vecteurs ont également été mutés en Ala puis ont été testés : ces mutations ne modifient ni la domiciliation de la mitogaligine-EGFP ni sa toxicité (résultats non montrés).

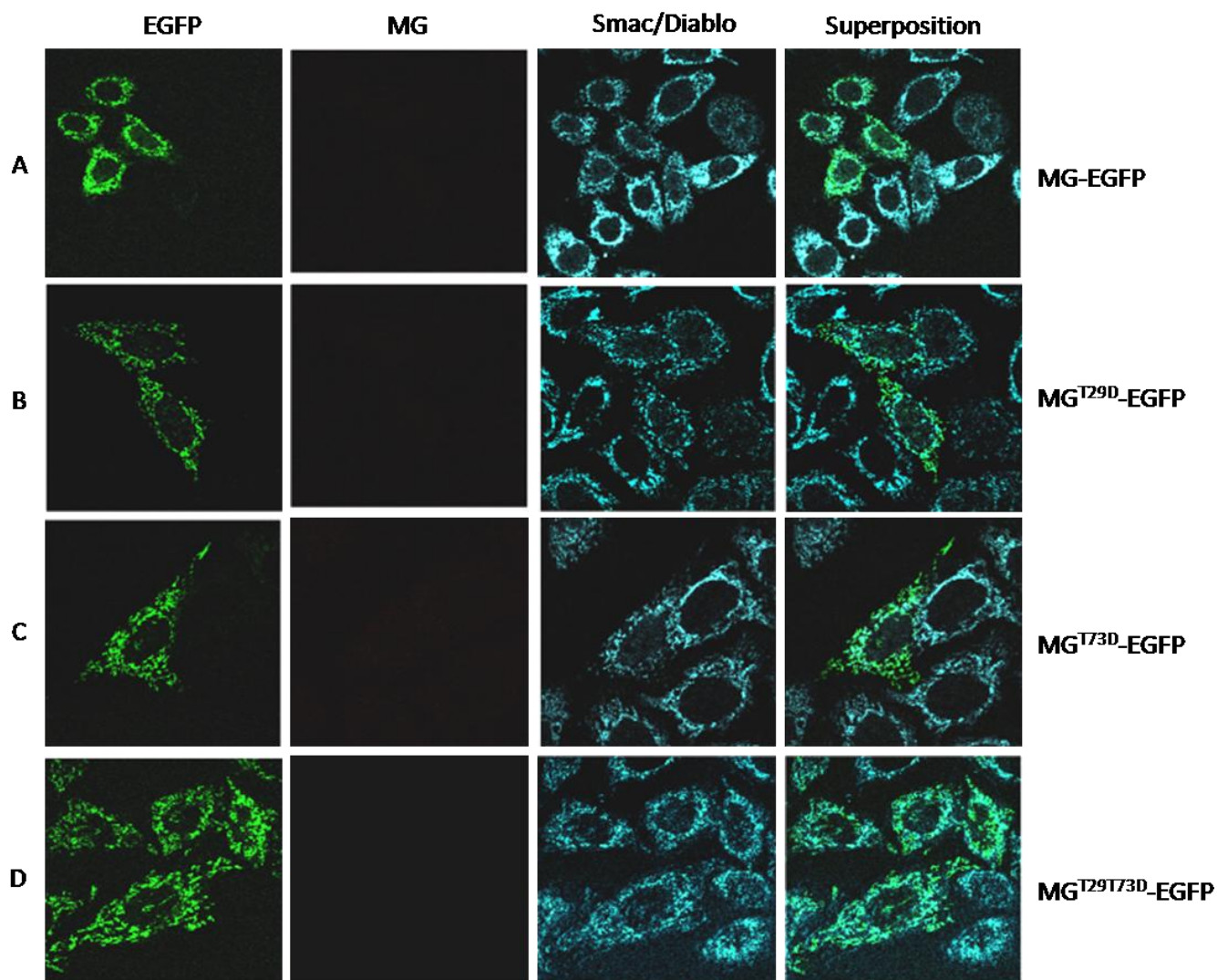


Figure 40 : La mitogaligine mutée sur les Thr 29 et Thr 73 en Asp conserve une localisation mitochondriale

Les cellules HeLa ont été transfectées par pMG-EGFP (A), pMG^{T29D}-EGFP (B), pMG^{T73D}-EGFP (C), pMG^{T29T73D}-EGFP (D). Les cellules ont été immuno-marquées, 24 h après transfection avec les anticorps anti-mitogaligine (MG) et anti-Smac/Diablo (Smac/Diablo), puis observées en microscopie confocale. Grossissement ×630 (A) et ×1000 (B à D). L'anticorps anti-mitogaligine ne marque pas la mitogaligine mitochondriale.

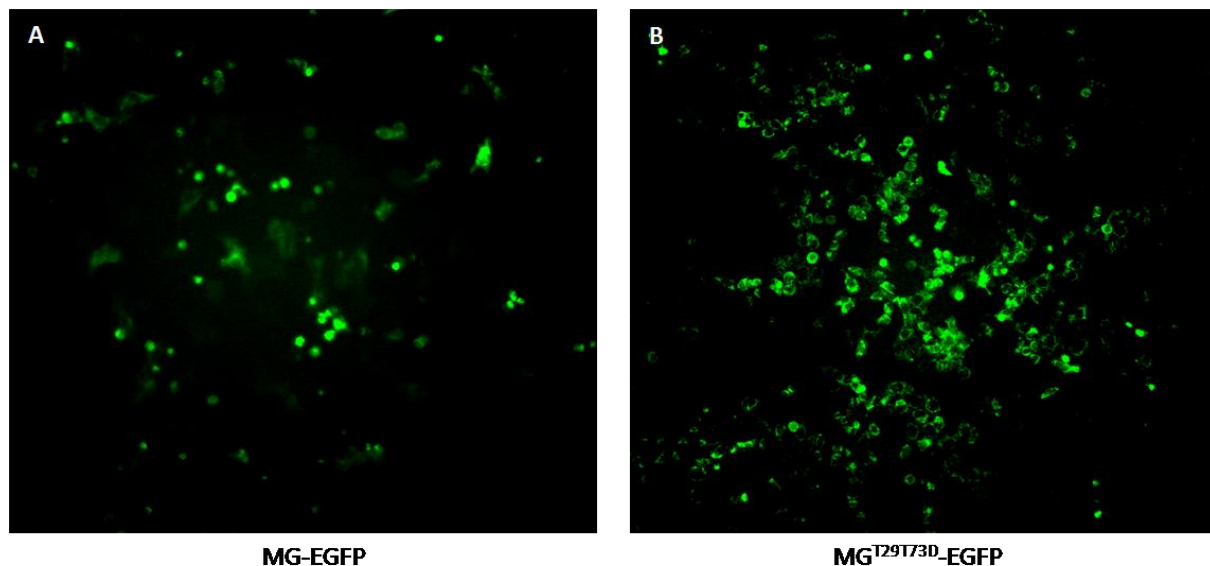


Figure 41 : La double mutation T29 et T73 en Asp augmente l'efficacité de transfection et/ou diminue la toxicité cellulaire

Les cellules HeLa ont été transfectées par pMG-EGFP (A), pMG^{T29T73D}-EGFP (B).
Les cellules ont été photographiées 24 h après transfection en microscopie de fluorescence.
Grossissement $\times 100$

Conclusion

Les mutations concomitantes des Thr 38 et Ser 39 en aspartate délocalisent la mitogaligine des mitochondries au profit du noyau et du cytoplasme. Celles des Thr 29 et Thr 73 maintiennent la protéine aux mitochondries. On constate néanmoins, une toxicité cellulaire atténuée lorsque ces derniers acides aminés sont mutés en résidus phospho-mimétiques.

I.3- Mimer la phosphorylation des résidus T29/T73 et T38/S39 atténue la protéolyse de la mitogaligine mitochondriale

Les protéines chimères mutées ont ensuite été testées par western-blot à l'aide d'un anticorps anti-GFP. Cet anticorps montre sa spécificité pour l'EGFP en la reconnaissant à la taille de 27 kDa (pistes 1A et 1B Figure 42). Comme nous l'avons vu précédemment et en témoin dans cette expérience, l'EGFP-mitogaligine ou forme nucléaire de la mitogaligine, est relativement stable et est détectée à la taille attendue de 39 kDa (piste 2A). La mitogaligine-EGFP, mitogaligine mitochondriale est quant à elle, détectée, comme attendue, sous la forme tronquée légèrement supérieure à la taille de l'EGFP seule (pistes 3A et 2B). Les mutations simultanées des Thr 29, Thr 38, Ser 39 et T73 en Asp de la mitogaligine-EGFP, délocalisant la protéine chimère des mitochondries, atténuent la protéolyse de la protéine

Partie II- Chapitre 3

Phosphorylation potentielle de la mitogaligine

(pistes 7A et 6B). La mitogaligine est détectée non pas à la taille de 39 kDa mais à une taille légèrement supérieure d'environ 45 kDa. De la même manière, les mutations individuelles des Thr 29, Thr 38, Ser 39 et T73 en Asp ne modifient en rien la protéolyse de la mitogaligine-EGFP (pistes 5A, 6A, 3B et 4B). Cependant, l'expression de la mitogaligine^{T38D}-EGFP et de la mitogaligine^{S39D}-EGFP est très faible et est difficile à détecter en western-blot (3B et 4B). Les mutations fonctionnent par paire : la Thr 29 avec la Thr 73 et la Thr 38 avec la Ser 39. La mutation des résidus de chaque paire en aspartate diminue la protéolyse de la protéine (pistes 4A, 8A, 5B et 7B). De plus, il semble y avoir un effet cumulatif des deux couples mutés sur la protéolyse de la mitogaligine-EGFP. En effet, la mitogaligine^{T29T73D}-EGFP et la mitogaligine^{T38S39D}-EGFP présentent toutes deux, des signes de dégradations protéiques, qui sont atténuées par l'action cumulée de ces deux double-mutations (pistes 4A, 7A et 8A).

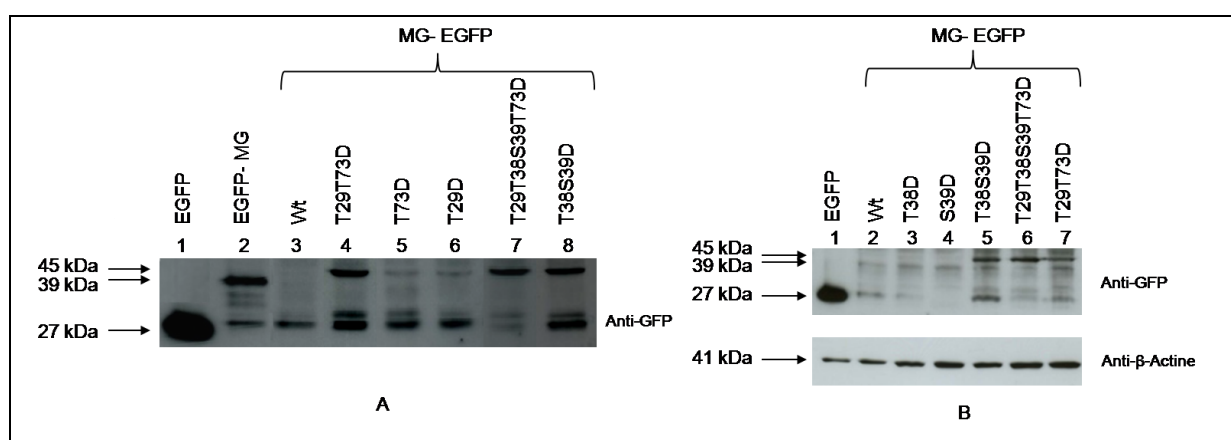


Figure 42 : Les couples de mutation T29T73D et T38S39D diminuent la protéolyse de la mitogaligine-EGFP

Les cellules HeLa ont été transfectées par pEGFP (1A et 1B), pEGFP-MG (2A et 2B), pMG-EGFP (Wt) (3A et 2B), pMG^{T29T73D}-EGFP (4A et 7B), pMG^{T29D}-EGFP (6A), pMG^{T73D}-EGFP (5A), pMG^{T38D}-EGFP (3B), pMG^{S39D}-EGFP (4B), pMG^{T38S39D}-EGFP (8A et 5B), pMG^{T29T38S39T73D}-EGFP (7A et 6B). Les cellules ont été lysées 24 h après transfection. Les extraits cellulaires ont été analysés par western-blot avec les anticorps anti-GFP (Figure A), anti-GFP et anti-β-actine (Figure B).

La mutation des thréonines et sérines, non plus en aspartate mais en alanine, de la mitogaligine montre une troncature comme pour la protéine sauvage (pistes 5A et 4B Figure 43). Ces résultats montrent que les mutations phospho-mimétiques des T29, T39, S39 et T73, semblent jouer un rôle direct dans la protéolyse de la mitogaligine.

Partie II- Chapitre 3

Phosphorylation potentielle de la mitogaligine

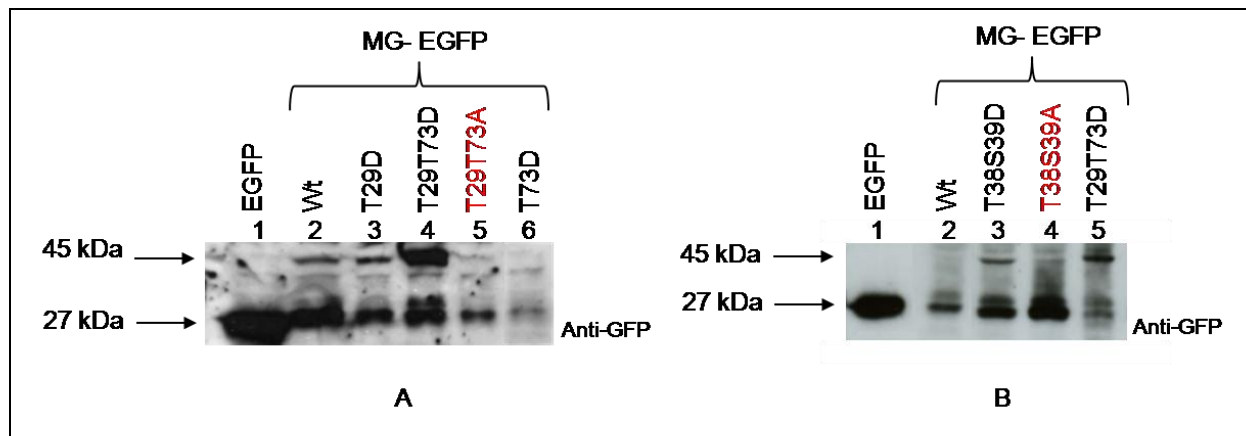


Figure 43 : La mitogaligine-EGFP conserve son caractère instable quand les couples de mutations T29T73 et T38S39 sont mutés en Ala

Les cellules HeLa ont été transfectées par pEGFP (1A et 1B), pMG-EGFP (2A 2B), pMG^{T29D}-EGFP (3A), pMG^{T29T73D}-EGFP (4A et 5B), pMG^{T29T73A}-EGFP (5A), pMG^{T73D}-EGFP (6A), pMG^{T38S39D}-EGFP (3B), pMG^{T38S39A}-EGFP (4B).

Les formes mutées en alanine représentent des mitogaligines non phosphorylables sur ces sites.

Les cellules ont été lysées 24 h après transfection. Les extraits cellulaires ont été analysés par western-blot avec les anticorps anti-GFP (Figures A et B).

Conclusion

L'ensemble de ces résultats indique que les mutations phospho-mimétiques des sites T38 et S39 jouent un rôle important dans la localisation mitochondriale de la mitogaligine. D'autre part, nous avons vu que les mutations des sites T38 et S39 et/ou T29 et T73 en aspartate diminuaient la protéolyse de la mitogaligine, suggérant ainsi une implication de ces sites dans la régulation de la dégradation de la protéine.

I.4- Toxicité des mutants de phosphorylation de la mitogaligine

La disparité, non seulement au niveau de l'efficacité de transfection mais également au niveau du nombre de cellules mortes observées suite à la transfection des différents vecteurs utilisés (tableau 14), suggère que les sites potentiels de phosphorylation T29, T38, S39 et T73 pourraient également être impliqués dans la toxicité de la protéine, complétant le rôle potentiel des phosphorylations dans la protéolyse et la localisation de la mitogaligine.

Protocole expérimental

Pour tester l'effet des mutations des sites potentiels de phosphorylation sur la toxicité de la mitogaligine, les vecteurs pEGFP, pMG-EGFP, pMG^{T29T38S39T73D}-EGFP, pMG^{T29T73D}-EGFP et pMG^{T38S39D}-EGFP ont été transfectés dans des cellules HeLa puis les cellules ont été photographiées 24 h après transfection sur des champs différents à petit grossissement $\times 100$. Le nombre de cellules totales transfectées et le nombre de cellules mortes transfectées ont été comptés. La moyenne des champs a été évaluée. L'expérience a été reproduite 2 fois, et la moyenne finale regroupe l'ensemble des moyennes. On a ensuite

reporté dans un tableau le pourcentage moyen de mort cellulaire évalué dans les cellules HeLa en fonction du vecteur transfecté (Figure 44).

Résultats

La mortalité des cellules transfectées par le vecteur de référence pEGFP a été estimée, dans les conditions de transfection utilisées, à 15% (histogramme EGFP Figure 44). L'activité apoptotique de la mitogaligine mitochondriale est significativement réduite lorsque les Thr 29, Thr 38, Ser 39 et Thr 73 sont mutées en Asp. La mutation de ces résidus diminue d'environ 50% la mort cellulaire induite par la mitogaligine-EGFP (histogramme T29T38S39T73D). Cet effet est d'autant plus flagrant quand la mitogaligine est mutée uniquement sur les résidus Thr 29 et Thr 73 en Asp. La mitogaligine^{T29T73D}-EGFP a perdu son activité cytotoxique, qui atteint le niveau basal de la toxicité induite par la transfection de l'EGFP (histogramme T29T73D). L'histogramme T38S39D montre, en revanche, que la toxicité de la mitogaligine est conservée malgré la mutation des résidus. Ceci indique que la phosphorylation des acides aminés T29 et T73 pourraient être impliquée dans l'induction de la mort cellulaire par la mitogaligine.

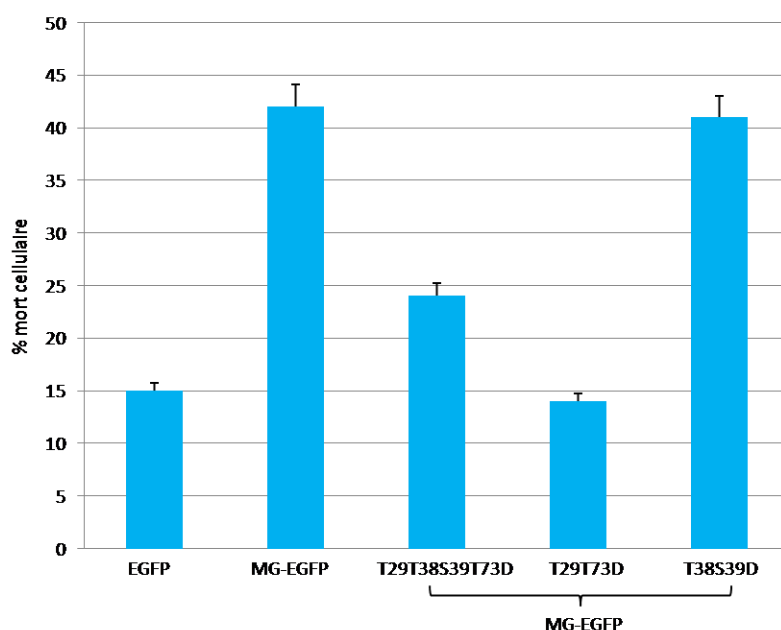


Figure 44 : Les mutations des sites potentiels de phosphorylation T29 et T73 diminuent la toxicité cellulaire induite par galig

Conclusion

Le remplacement des résidus T29 et T73 par des aspartates diminue la toxicité cellulaire induite par galig. La phosphorylation pourrait être impliquée dans la fonction cytotoxique de la mitogaligine. Sous une forme phosphorylée sur ces sites et non tronquée, la protéine serait inactive, bloquant ainsi le processus de mort cellulaire.

II- Autres sites de phosphorylations testés qui n'ont pas de rôle apparent dans l'activité de la mitogaligine

Protocole expérimental

D'autres sites potentiels de phosphorylation de la mitogaligine ont été prédits par programmes bioinformatiques (Tableau 12). Des vecteurs mutés individuellement sur ces sites potentiels de phosphorylation ont été construits puis testés dans des cellules HeLa (Tableau 15).

Tableau 15 : Autres vecteurs pour l'étude de la phosphorylation potentielle de la mitogaligine

Nom des plasmides	Protéines codées	Sites mutés
pEGFP	EGFP	-
pMG-EGFP-CG	mitogaligine-EGFP	-
pMG ^{S34D} -EGFP	mitogaligine-EGFP	Ser 34 en Asp
pMG ^{S52D} -EGFP	mitogaligine-EGFP	Ser 52 en Asp
pMG ^{S57D} -EGFP	mitogaligine-EGFP	Ser 57 en Asp
pMG ^{S79D} -EGFP	mitogaligine-EGFP	Ser 79 en Asp
pMG ^{T29T62D} -EGFP	mitogaligine-EGFP	Thr 29 et Thr 62 en Asp

Nous avons obtenu un vecteur pMG^{T29T62D}-EGFP, codant pour la mitogaligine fusionnée à l'extrémité C-terminale, mutée à la fois sur les Thr 29 et Thr 62 en Asp lorsque nous avons cherché à construire le plasmide pMG^{T29T38S39T62T73D}-EGFP. Nous avons donc utilisé ce vecteur pour tester la Thr 62.

Résultats

La mitogaligine-EGFP reste mitochondriale, quelles que soient les mutations S34D, S52D, S57D, T29T62D ou S79D (Figure 45).

Partie II- Chapitre 3

Phosphorylation potentielle de la mitogaligine

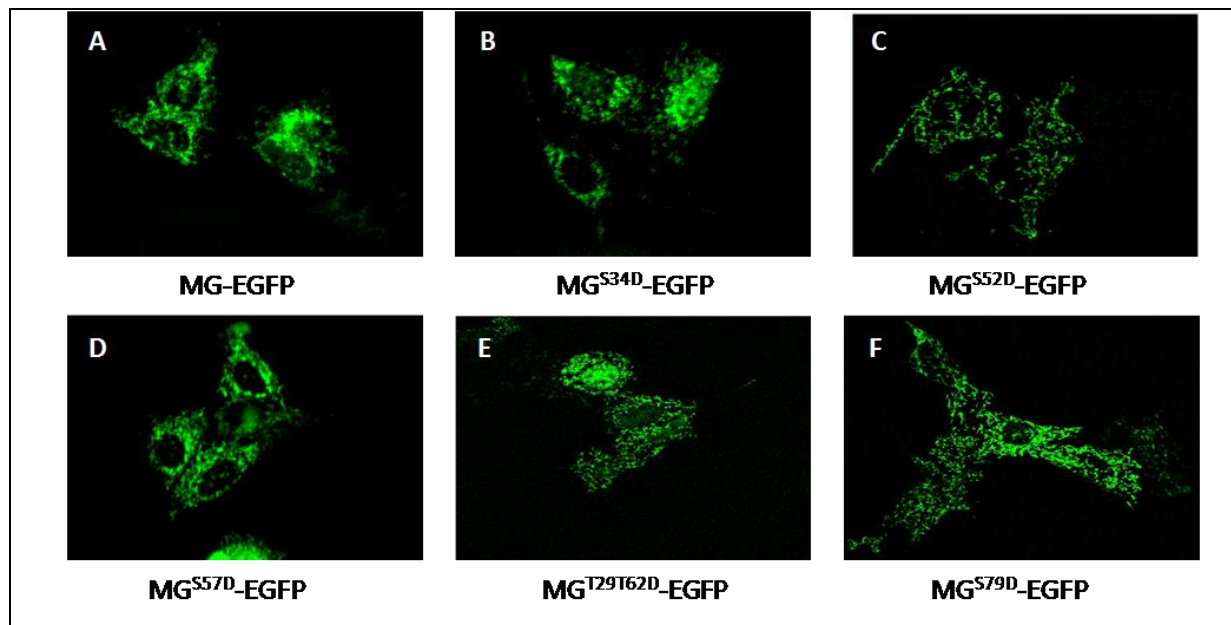


Figure 45 : Autres sites potentiels de phosphorylation testés, n'ayant pas de rôle apparent dans la fonction de la mitogaligine-EGFP

Les cellules HeLa sont transfectées par pMG-EGFP (A), pMG^{S34D}-EGFP (B), pMG^{S52D}-EGFP (C), pMG^{S57D}-EGFP (D), pMG^{T29T62D}-EGFP (E), pMG^{S79D}-EGFP (F). Les cellules ont ensuite été observées 24h après transfection en microscopie confocale. Grossissement $\times 630$

Les mutations des autres sites potentiels de phosphorylation testés en microscopie de fluorescence, qui n'ont pas laissé apparaître une modification de la localisation ont également été testés en western-blot (Figure 46). Les mutations de la Thr 62, Ser 79, Ser 57 et S52 en Asp ne semblent pas jouer de rôle dans la protéolyse de la chimère, sous forme individuelle ou associée à la Thr 29 pour la Thr 62. On ne peut cependant pas l'exclure dans la mesure où nous avons vu qu'une seule mutation n'est pas toujours suffisante pour induire un changement d'activité ou de localisation.

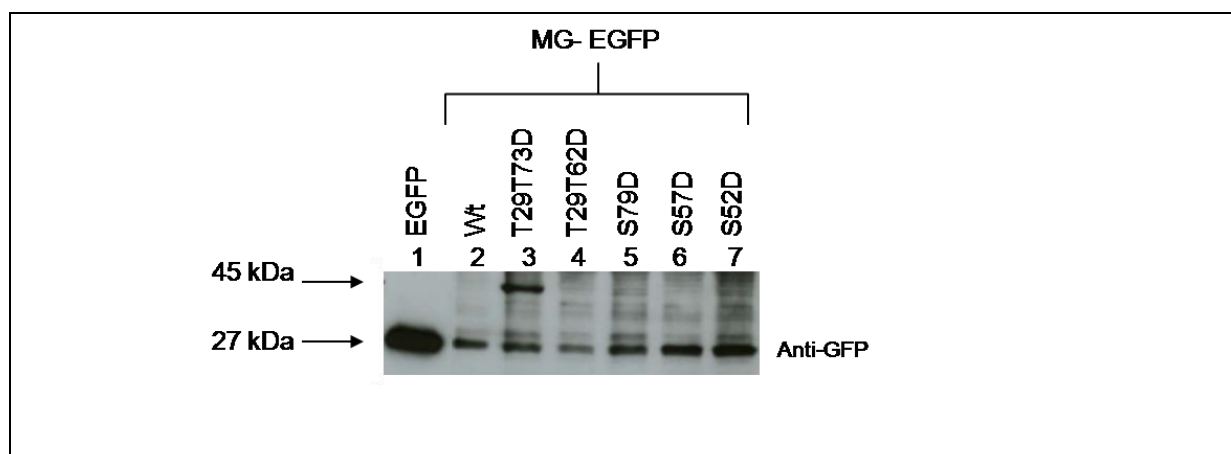


Figure 46 : Les autres sites potentiels de phosphorylation n'ont pas de rôle apparent dans la protéolyse de la mitogaligine-EGFP

Les cellules HeLa sont transfectées par pEGFP (1), pMG-EGFP (Wt) (2), pMG^{T29T73D}-EGFP (3), pMG^{T29T62D}-EGFP (4), pMG^{S79D}-EGFP (5), pMG^{S57D}-EGFP (6), pMG^{S52D}-EGFP (7). Les cellules ont ensuite été lysées 24h après transfection. Les extraits cellulaires ont été analysés par western-blot avec l'anticorps anti-GFP.

Chapitre 4 : Mutation des cystéines de la mitogaligine

Les cystéines des protéines sont impliquées dans plusieurs événements post-traductionnels. D'une part, elles sont responsables de la conformation de la protéine en établissant des liaisons disulfures intra et intermoléculaires. Ce changement de structure dépend du compartiment cellulaire dans lequel la protéine se trouve et peut influencer sur l'activité de la protéine (Ostergaard *et al*, 2004). D'autre part, les cystéines sont également des sites potentiels de palmitoylation et isoprénnylation, soit des modifications lipidiques des protéines, qui peuvent favoriser leur insertion au niveau de membrane et ainsi modifier leur activité (Kleuss et Krause, 2003 ; Sebt *et al*, 2005). La mitogaligine possède 6 cystéines. Des mutations de ces cystéines en sérine ont donc été réalisées à la fois sur la mitogaligine-EGFP, protéine de fusion mitochondriale et sur l'EGFP-mitogaligine, protéine chimère nucléaire.

I- Mutation des cystéines de la mitogaligine mitochondriale

Protocole expérimental

Les cellules HeLa sont ensuite transfectées par ces plasmides (tableau 16) puis observées en microscopie de fluorescence.

Tableau 16 : Plasmides construits pour étudier l'effet de la mutation des cystéines sur la localisation de la mitogaligine

Nom du plasmide	Protéines codées	Mutations introduites Cys en Ser
pMG-EGFP	mitogaligine-EGFP	-
pMG ^{4CS} -EGFP	mitogaligine-EGFP	C54, C82, C90 et C95
pMG ^{5CS} -EGFP	mitogaligine-EGFP	C54, C76, C82, C90 et C95
pMG ^{5CS2} -EGFP	mitogaligine-EGFP	C10, C54, C82, C90 et C95
pMG ^{C10S} -EGFP	mitogaligine-EGFP	C10
pMG ^{C76S} -EGFP	mitogaligine-EGFP	C76

Résultats

La transfection par pMG-EGFP révèle de nombreuses cellules mortes. Dans les cellules vivantes, la fluorescence détectée est typiquement localisée au niveau du réseau mitochondrial (photo A Figure 47). Les cellules transfectées par tous les autres vecteurs ont un aspect semblable. Les mutations ne semblent donc avoir aucun effet sur la fonction cytotoxique et la localisation mitochondriale de la mitogaligine (photo B à F).

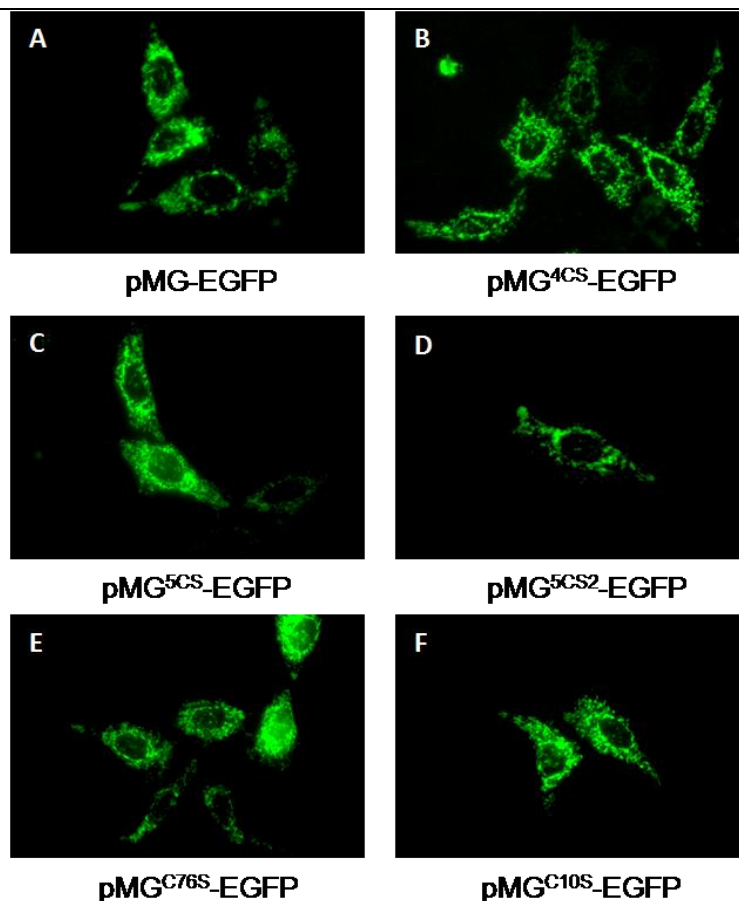


Figure 47 : Mutation des cystéines de la mitogaligine-EGFP et localisation cellulaire

Les cellules HeLa sont transfectées par : pMG-EGFP (mitogaligine non mutée): Localisation mitochondriale de la mitogaligine et témoin de toxicité (A), pMG^{4CS}-EGFP (B), pMG^{5CS}-EGFP (C), pMG^{5CS2}-EGFP (D), pMG^{C76S}-EGFP (E), pMG^{C10S}-EGFP (F). Les Cys sont mutées en Ser. Les cellules sont transfectées et analysées 24 heures après transfection par microscopie de fluorescence.

II- Mutation des cystéines de la mitogaligine nucléaire

Protocole expérimental

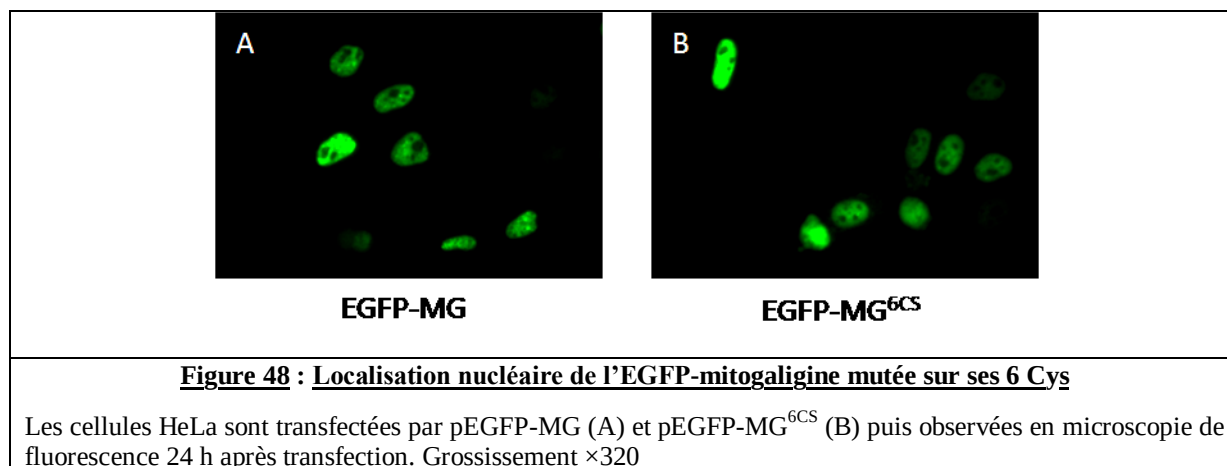
Des cellules HeLa ont été transfectées par les vecteurs d'expression pEGFP-MG ou pEGFP-MG^{6CS} (Tableau 17).

Tableau 17 : Plasmides construits pour étudier l'effet de la mutation des cystéines sur la localisation de la mitogaligine

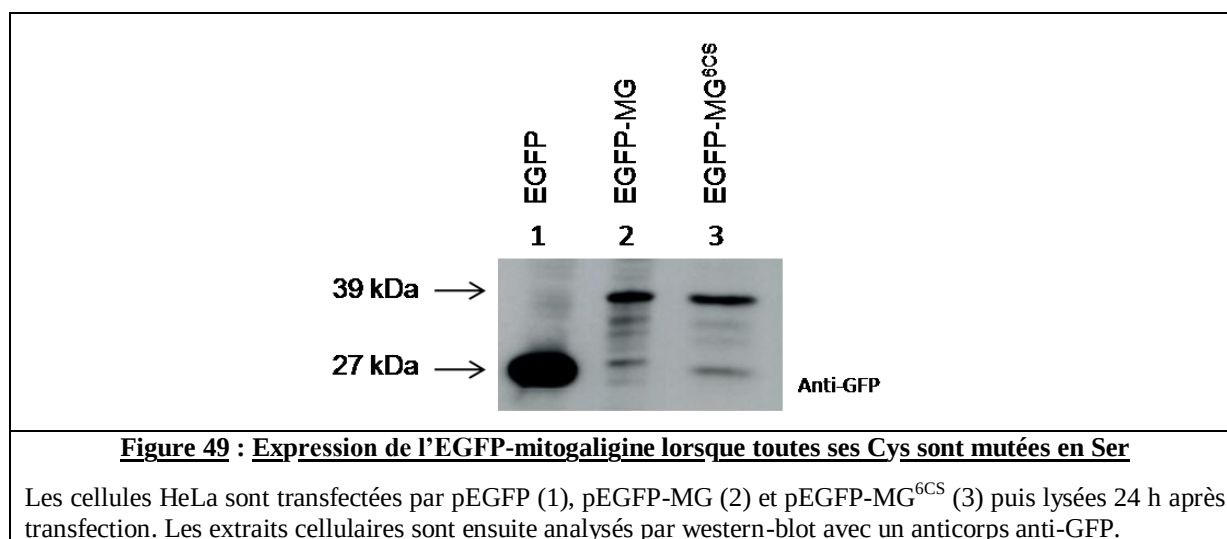
Nom des plasmides	Protéines codées	Sites mutés en Ser
pEGFP-MG	EGFP-mitogaligine	-
pEGFP-MG ^{6CS}	EGFP-mitogaligine	C10, C54, C76, C82, C90 et C95

Résultats

Les cellules transfectées par pEGFP-MG présentent la localisation attendue de la protéine de fusion EGFP-mitogaligine, à savoir une fluorescence associée au noyau (photo A Figure 48). Les mutations des 6 cystéines en sérine n'altèrent pas la localisation de l'EGFP-mitogaligine, cette dernière reste en effet nucléaire (photo B Figure 48). De plus, d'un point de vue qualitatif, la toxicité de ces vecteurs est comparable. La mitogaligine fusionnée en N-terminale à l'EGFP est extrêmement toxique et entraîne rapidement la mort des cellules, ce qui est également le cas lorsque ses cystéines sont mutées.



Les extraits protéiques des cellules transfectées par pEGFP-MG ou pEGFP-MG^{6CS} sont ensuite analysés par western-blot avec un anticorps anti-GFP (Figure 49). La piste 1 est un contrôle correspondant à l'EGFP détectée dans des cellules transfectées par un vecteur codant l'EGFP seule. L'EGFP apparaît à la taille correcte de 27 kDa. La protéine de fusion EGFP-mitogaligine est relativement stable puisqu'elle est en majorité présente à la taille attendue de 39 kDa (piste 2). La mutation des cystéines de la mitogaligine ne semble pas modifier la stabilité de la protéine de fusion puisqu'elle est en grande partie retrouvée sous la forme non clivée de 39 kDa (piste3).



 Conclusion

Les cystéines ne semblent pas avoir de rôle important dans la fonction de la mitogaligine dans la mesure où leur mutation n'engendre aucune modification de localisation. Le ciblage au noyau et aux mitochondries ne semble donc résulter ni de l'établissement de ponts disulfures ni de modifications lipidiques.

De part une analyse qualitative, basée sur l'observation des cellules transfectées mortes ou en cours d'apoptose, la toxicité des protéines chimères mutées est équivalente à celle de la mitogaligine sauvage. D'autre part, la mitogaligine mitochondriale reste dégradée malgré les mutations des différentes cystéines (résultat non montré). Ces acides aminés ne semblent donc pas être impliqués dans l'activité de la protéine.

Conclusions/ Discussions/ Perspectives

Probable régulation de l'activité de la mitogaligine par phosphorylation

La mutagenèse dirigée contre les sites potentiels de phosphorylation de la mitogaligine nous a permis de mettre en évidence l'implication des acides aminés T29, T38, T73 et S39, dans le trafic cellulaire et/ou la protéolyse de la protéine. La mitogaligine mutée simultanément sur les sites 29 et 73 en aspartate, mimant une phosphorylation, reste mitochondriale et non dégradée tandis qu'elle est délocalisée des mitochondries au profit du noyau et du cytosol lorsqu'elle est mutée simultanément sur les acides aminés T38S39 en Asp. En revanche, des mutations individuelles de ces résidus n'ont pas d'effet. De plus la mutation des résidus T29 et T73 diminue l'effet toxique de la mitogaligine, voir l'inhibe quand elle mime une phosphorylation. Les mutations des thréonines 29, 38, 73 et sérine 39 en alanine, empêchant une éventuelle phosphorylation, rétablissent la localisation mitochondriale, la dégradation et la cytotoxicité de la mitogaligine. La phosphorylation pourrait donc réguler l'activité apoptotique de la mitogaligine de par sa protéolyse et sa localisation.

Trafic mitochondrio-nucléaire de la mitogaligine

La localisation intracellulaire de la mitogaligine semble être critique pour la régulation de l'activité apoptotique de la protéine. En effet, la mitogaligine mitochondriale induit la mort des cellules *via* une voie indépendante de la caspase-3 (Duneau, thèse 2005) tandis que la mitogaligine nucléaire induit une apoptose classique et davantage toxique (Gonzalez *et al*, 2009). Cependant, le mécanisme qui contrôle la localisation cellulaire de la mitogaligine reste indéterminé. De par la mutagenèse dirigée contre les sites potentiels de phosphorylation, nous avons pu mettre en évidence que la phosphorylation potentielle des résidus T38 et S39 de la mitogaligine pourrait être impliquée dans le trafic intracellulaire de la protéine. En effet, la mutation de ces résidus en aspartate, mimant une phosphorylation potentielle, délocalise la mitogaligine des mitochondries au profit du noyau et du cytoplasme. Ceci n'est pas surprenant dans la mesure où le transport nucléaire de beaucoup de protéines est connu pour être régulé par phosphorylation (Gasiorowski et Dean, 2003). Que ce soit par le système classique d'import nucléaire, système des importines, ou par un système plus spécifique tel que le système de transport des protéines SR, des kinases spécifiques interviennent pour influencer la localisation des protéines (Riolobos *et al*, 2010 ; Zhong *et al*, 2009). Nous avons vu, dans la discussion de la partie I, que les protéines aux NLS non conventionnels pouvaient utiliser ces systèmes d'import nucléaire (Zhu *et al*, 2005 ; Kataoka *et al*, 1999 ; Lai *et al*, 2000).

L'un des domaines RS de la mitogaligine concerne l'arginine 40, située en aval de la sérine 39 et de la thréonine 38. Il a été montré que l'arginine 40 possède un rôle important dans la rétention ou le transport au noyau de la mitogaligine. La phosphorylation de ces résidus dans le domaine RS pourrait alors recruter le système d'import spécifique des protéines SR. Il faudrait tester l'effet de ces mutations sur la mitogaligine nucléaire, soit EGFP-MG.

La phosphorylation des thréonine 38 et sérine 39 pourrait également permettre la reconnaissance de la mitogaligine par des protéines, telles que la protéine 14-3-3, qui serait alors chargée de transloquer la protéine au noyau (Umahara et Uchihara, 2010). La protéine 14-3-3 est nucléaire dans les cellules positives au TUNEL (Henshall *et al*, 2002). Cette hypothèse est donc d'autant plus valable que l'expression de la mitogaligine nucléaire s'accompagne d'une dégradation de l'ADN en fragments oligonucléosomiques typiques de l'apoptose (Gonzalez *et al*, 2009). La reconnaissance de la mitogaligine par une protéine cargo dépendrait alors de sa structure, elle-même fonction de l'état de phosphorylation de la protéine.

Nous ne pouvons cependant pas exclure le fait que cette délocalisation des mitochondries soit due à la mutation de résidus du signal de localisation mitochondriale, d'autant plus que des charges négatives sont rajoutées. Néanmoins, la mutation de ces mêmes résidus en alanine ne modifie pas la localisation mitochondriale de la protéine, ce qui suggère qu'une phosphorylation est également possible. Pour confirmer nos résultats, nous pourrions immunoprécipiter la mitogaligine et la révéler avec des anticorps anti-phosphothréonines et anti-phosphosérines.

Protéolyse de la mitogaligine : une régulation par phosphorylation ?

La mitogaligine mitochondriale est une protéine rapidement clivée et/ou dégradée, comme beaucoup de protéines apoptotiques. La stabilité des protéines est essentielle pour la survie ou la mort des cellules (Lee, 2003). Le système majeur de dégradation des protéines dans les cellules eucaryotes est le système ubiquitine-protéasome (Hershko et Ciechanover, 1998). Dans le but de savoir si la dégradation de la mitogaligine mitochondriale dépend de ce système, nous avons inhibé le protéasome avec du MG-132 dans les cellules transfectées par un vecteur codant la mitogaligine. L'inhibition du protéasome atténue la protéolyse de la protéine (Figure 34).

Même si le mécanisme de dégradation protéique par le protéasome est aujourd'hui bien connu, les signaux qui conduisent à cette protéolyse restent, quant à eux, obscurs. La phosphorylation est l'un de ces signaux qui régule la dégradation des protéines (Fang et Weissman, 2004). Par exemple, la phosphorylation de Bim sur les sérines 55, 65 et 73 augmente la réponse apoptotique par réduction de sa dégradation par le système ubiquitine-protéasome (Hübner *et al*, 2008). Nous avons montré que la mutation des sites potentiels de phosphorylation, soit les thréonines 29 et 73 en aspartate, mimant ainsi une phosphorylation potentielle, diminue la dégradation de la mitogaligine. Au contraire, leur mutation en alanine, empêchant ainsi toute phosphorylation potentielle, rétablit la dégradation protéique. La phosphorylation de ces résidus semble tenir une place importante dans l'activité de la mitogaligine. Une immunoprécipitation de la mitogaligine avec des anticorps anti-phosphothréonines est alors indispensable.

Mitogaligine mitochondriale et protéasome

La mitogaligine mitochondriale semble active sous une forme dégradée. Son effet cytotoxique est atténué en présence de l'inhibiteur du protéasome MG-132 mais également lorsqu'elle est mutée sur les résidus Thr 29 et Thr 73 et/ou Thr 38 et Ser 39 en Asp, soit quand la protéine est non dégradée. La mitogaligine pourrait donc nécessiter une dégradation de son extrémité N-terminale pour acquérir son activité apoptotique. En ce sens, elle pourrait s'identifier à la protéine Bid, dont la dégradation du fragment N-terminal, issu du clivage par la caspase-8, est indispensable à la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (Tait *et al*, 2007). La dégradation de la mitogaligine est liée à sa localisation mitochondriale. Depuis peu, des systèmes spécifiques de dégradation des protéines mitochondriales *via* des protéases ou le protéasome mitochondrial ont été découverts (Germain, 2008). La mitogaligine pourrait alors être dégradée *via* ce système.

Mitogaligine et ubiquitinylation

La mitogaligine semble être dégradée selon un processus dépendant du protéasome. Cependant la mutation de la lysine 75 en arginine, unique lysine de la mitogaligine, n'affecte pas la demi-vie de la protéine (Figure 36). La dégradation de la mitogaligine par le protéasome pourrait donc être indépendante d'une ubiquitinylation (Germain, 2008) ou bien dépendante d'une ubiquitinylation particulière. Il a été rapporté des cas d'ubiquitinylation au niveau du NH₂ libre à l'extrémité N-terminale de la protéine. Cette extrémité N-terminale de la protéine peut agir comme un site accepteur d'ubiquitine et stimuler ensuite le système ubiquitine-protéasome. (Breitschopf, 1998). Cette hypothèse pourrait alors expliquer le fait que la mitogaligine nucléaire ne soit pas dégradée : la fusion de l'EGFP à l'extrémité N-terminale empêche la fixation de l'ubiquitine et donc la dégradation de la mitogaligine.

D'autres cas particuliers d'ubiquitinylation ont été décrits. La protéolyse du fragment N-terminal de Bid suite à son clivage par la caspase-8, s'effectue par le système ubiquitine-protéasome non pas au niveau de résidus lysines mais au niveau de sites particuliers tels que les cystéines, sérines et thréonines (Tait *et al*, 2007 ; Cadwell et Coscoy, 2005). En ce sens, la dégradation de la mitogaligine pourrait être assimilée à celle de Bid : les résidus thréonines 29 et 73 ne seraient alors donc pas impliqués dans une phosphorylation régulant la dégradation mais seraient des acteurs directs de dégradation par leur capacité à fixer des molécules d'ubiquitines. On ne peut néanmoins pas exclure que la dégradation de la mitogaligine par le protéasome soit indépendante de l'ubiquitinylation (Shabek *et al*, 2009 ; Jariel-Encontre *et al*, 2008).

Par ailleurs, le protéasome possède également une fonction endo-protéolytique (Jariel-Encontre *et al*, 2008). Il clive des polypeptides et permet ainsi la maturation de précurseurs latents en molécules biologiquement actives ou au contraire, permet d'inactiver des protéines. Ces réactions se font indépendamment d'une ubiquitinylation. La mitogaligine pourrait alors être clivée et activée par le protéasome au sein des mitochondries.

 Rôle des cystéines dans la localisation de la mitogaligine

Les fonctions thiols des cystéines ont un rôle important dans l'organisation et la structure 3D d'une protéine en établissant des liaisons disulfures mais également des liaisons hydrogènes. Elles permettent, en complément de liaisons disulfures et de conjugaisons lipidiques, la bonne conformation du récepteur pour sa reconnaissance par son ligand et son activation (Stitham *et al*, 2006). Quelle que soit la localisation de la mitogaligine, les mutations des cystéines en sérine n'ont aucun effet sur sa domiciliation cellulaire. De plus, la fonction cytotoxique de la protéine est conservée puisque le nombre de cellules mortes est comparable à celui des cellules transfectées avec la mitogaligine non mutée. Il ne semble donc pas y avoir de rôle majeur de ces cystéines dans son ciblage.

On ne peut, en revanche, pas exclure une implication de ces cystéines dans des modifications protéiques par les lipides. En effet la palmitoylation ou l'isoprénnylation sont des modifications post-traductionnelles des protéines qui s'effectuent sur une cystéine au voisinage de l'extrémité C-terminale de la protéine (Zhou *et al*, 2006 ; Sebti, 2005). Pour une meilleure interaction avec les membranes, certaines protéines acylées ou prénylées requièrent un second signal qui peut être la présence d'un domaine basique de la protéine ou d'une autre modification lipidique. L'exemple le plus classique est la protéine Src qui contient à la fois un myristate et un domaine basique, qui l'un sans l'autre ne sont pas suffisants pour induire une liaison stable de la protéine dans la membrane (Sigal *et al*, 1994 ; Murray *et al*, 1997). Le signal de localisation mitochondriale de la mitogaligine constitue un domaine basique qui pourrait nécessiter la présence d'une isoprénnylation d'une des cystéines de l'extrémité C-terminale pour que la protéine puisse interagir plus fortement avec les membranes externes mitochondriales. Il a également été montré que le domaine basique serait un élément de régulation permettant de décrocher la protéine de la membrane. Ainsi, la phosphorylation du domaine basique de la protéine MARCKS (*myristoylated alanine-rich C-kinase substrate*) provoque son décrochement de la membrane (McLaughlin et Aderem, 1995). Les mutations des sites potentiels de phosphorylation Thr 38 et Ser 39 en aspartate, mimant ainsi une phosphorylation, et situés au niveau du MLS de la mitogaligine provoquent, en effet, une délocalisation de la protéine dans le cytoplasme et dans le noyau. Cette hypothèse est d'autant plus plausible que l'isoprénnylation d'une cystéine s'effectue dans un contexte CAAX ou A représente un acide aminé aliphatique et X détermine si la cystéine est farnesylée (X= Met, Ser) ou geranylgeranylée (X= Leu) (Sebti, 2005). La prénylation de la cystéine de la boîte CAAX engendre la protéolyse des 3 derniers acides aminés AAX et la carboxy-méthylation de l'extrémité C-terminale (Philips *et al*, 1993). La cystéine 76 de la mitogaligine est dans un contexte CAAX. Sa prénylation au sein des mitochondries engendrerait la protéolyse de la protéine au niveau du résidu cystéine et la visualisation de la protéine chimère serait en fait la visualisation du fragment 77 à 97 de la mitogaligine couplé en C-terminale à l'EGFP. La taille de la protéine chimère clivée serait alors d'environ 30 kDa, ce qui coïncide également avec la forme dégradée de la protéine détectée avec l'anticorps anti-GFP par analyse western-blot (Figure 33). Ceci dit, cette modification post-traductionnelle n'est pas suffisante en elle-même pour induire une délocalisation des mitochondries. Cette prénylation pourrait donc nécessiter une acylation ou prénylation sur une

autre cystéine au préalable, et l'action cumulée de ces modifications lipidiques entraînerait la perte de localisation mitochondriale de la protéine.

Partie III

**Régulation du processus apoptotique initié par galig :
Interaction avec la protéine anti-apoptotique Mcl-1**

Introduction

La survie ou la mort de la cellule est fonction de la balance entre molécules pro-apoptotiques et molécules anti-apoptotiques. Les protéines de régulation de la mort cellulaire programmée les plus connues sont celles de la famille de Bcl-2. Ces membres peuvent être pro-apoptotiques tels que Bak ou anti-apoptotiques tels que Bcl-2, Bcl-X_L et Mcl-1. Même si les galigines n'ont aucune homologie avec les membres de la famille Bcl-2, il a été montré au laboratoire que Bcl-X_L diminue la toxicité cellulaire induite par l'expression du gène galig (Duneau *et al*, 2005). Par contre, aucun effet protecteur de Bcl-2 n'a été observé. Ces résultats supposent que galig peut interagir avec certaines protéines de la famille de Bcl-2.

Par RT-PCR, il a également été montré que les cellules qui expriment le plus galig sont les leucocytes du sang périphérique (Guittaut *et al*, 2001). Parmi ces cellules, les polynucléaires semblent de bon candidats car ils sont en différenciation terminale et meurent rapidement par apoptose spontanée si aucun signal de survie ne leur est envoyé (Séité *et al*, 2000). Dans ces cellules, la protéine anti-apoptotique principale est Mcl-1 (*Myeloid Cell Leukemia 1*), une protéine de la famille Bcl-2 (Moulding *et al*, 1998 ; Dzhagalov *et al*, 2007). Ces deux gènes étant exprimés dans le même type cellulaire, il était donc intéressant d'étudier une possible relation fonctionnelle entre ces deux gènes.

Résultats

I- Effets antagonistes de Mcl-1 et galig

Protocole expérimental

Co-transfection

Les cellules HeLa (2.10^5 cellules par puits) sont mises en culture 24 heures dans une boîte de 6 puits. Les cellules sont ensuite cotransfectées avec les plasmides (2 µg de chaque par transfection) du tableau ci-dessous à raison de 4,5 µl de PEI 10 µM pour 1 µg de plasmide.

Tableau 18 : Plasmides utilisés pour étudier les effets antagonistes de Mcl-1 et galig

« Ø » symbolise que pG5luc ne code aucune protéine

Noms des plasmides	Protéines codées
pG5luc pEGFP	Ø (pour une quantité d'ADN équivalente dans les transfections) EGFP
pEGFP pMcl-1	EGFP Mcl-1
pG5luc pMG-EGFP	Ø Mitogaligine-EGFP
pMG-EGFP pMcl-1	Mitogaligine-EGFP Mcl-1

Microscopie de fluorescence

Les transfections ont ensuite été vérifiées : les cellules observées par microscopie de fluorescence par le biais des vecteurs exprimant l'EGFP, puis photographiées (Partie II).

Lyse des cellules/ Dosage protéique/ Western-blot : Matériels et méthodes partie II.

Les anticorps utilisés en western-blot sont indiqués dans le tableau 19.

Parie III- Chapitre 1 **Expression simultanée de galig et Mcl-1**

**Tableau 19 : Anticorps utilisés en western-blot pour l'étude de l'expression des galigines
en présence de Mcl-1**

Anticorps	Produit chez	Concentration	Fournisseur	Clone
Anti-GFP	Lapin	1/ 50 000	Abcam	Ab290
Anti-Mcl-1	Lapin	1/ 1 000	Santa-Cruz	Polyclonal-S-19
Anti- β -Actine	Souris	1/ 300 000	Sigma	AC-15
Anti-Flag	Souris	1/ 2 000	Sigma	F3165
Anti-HRP	Lapin	1/ 2 000 000	Sigma	Polyclonal
Anti-HRP	Souris	1/ 500 000	Proméga	Polyclonal

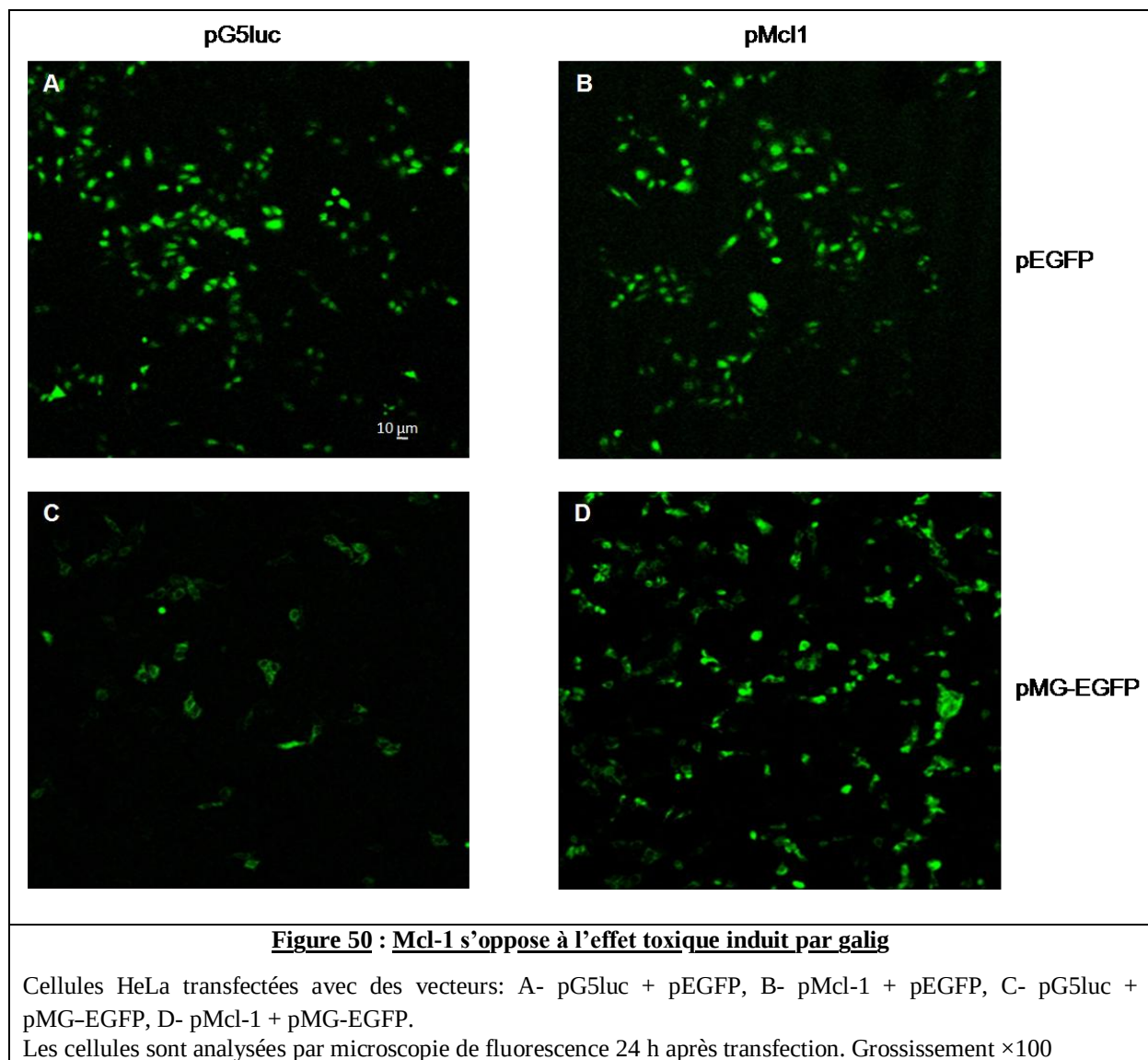
Résultats

L'EGFP et la protéine de fusion mitogaligine-EGFP présentent la localisation attendue : l'EGFP est diffuse dans l'ensemble de la cellule (A et B Figure 50), la mitogaligine-EGFP est localisée dans les mitochondries (C et D).

De manière attendue, les cellules co-transfectées avec le plasmide de référence pG5luc et les plasmides codant les galigines (pMG-EGFP) (C) permettent d'observer une nette diminution du nombre de cellules fluorescentes par rapport aux cellules témoins co-transfectées avec le plasmide de référence et le plasmide codant EGFP (A). De plus, la majeure partie de ces cellules fluorescentes présentent une morphologie typique des cellules en apoptose, à savoir une diminution de leur taille, une condensation des organites intracellulaires et du cytoplasme.

La co-transfection du plasmide codant la protéine anti-apoptotique Mcl-1 avec le plasmide codant l'EGFP ne modifie pas le nombre, ni l'aspect des cellules transfectées (B). En revanche, la co-transfection des cellules avec les plasmides codant la protéine de fusion et avec le plasmide codant Mcl-1, témoigne d'une nette augmentation du nombre de cellules transfectées et d'une augmentation du nombre de cellules fluorescentes de morphologie normale (D).

Les cellules exprimant le gène galig apparaissent donc beaucoup moins « stressées » en présence de Mcl-1. Ce résultat suggère que la surexpression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 s'oppose à l'effet toxique de galig.



Ce résultat a également été confirmé par western-blot (Figure 51). Les pistes 1 et 2 sont des contrôles correspondant à l'expression de l'EGFP en absence ou en présence de Mcl-1. La surexpression de Mcl-1 n'influe pas sur l'expression de l'EGFP. Alors que l'intensité de la mitogaligine-EGFP détectée est faible après co-transfection avec le vecteur pG5luc (piste 3), l'intensité de cette dernière augmente lorsque Mcl-1 est surexprimée dans les cellules (piste 4). L'augmentation de l'expression de la mitogaligine-EGFP reflète le résultat précédent montrant la protection de Mcl-1 dans les cellules exprimant galig. Mcl-1 « autorise » l'expression de galig dans les cellules. La diminution de la mortalité accroît le nombre de cellules transfectées par galig, ce qui se traduit par une augmentation de la production de mitogaligine-EGFP. La mitogaligine-EGFP est détectée sous une forme clivée dont la taille est légèrement supérieure à celle de l'EGFP seule (27 kDa) (pistes 3 et 4). La présence de Mcl-1 n'empêche donc pas la protéolyse de la mitogaligine-EGFP.

Partie III- Chapitre 1

Expression simultanée de galig et Mcl-1

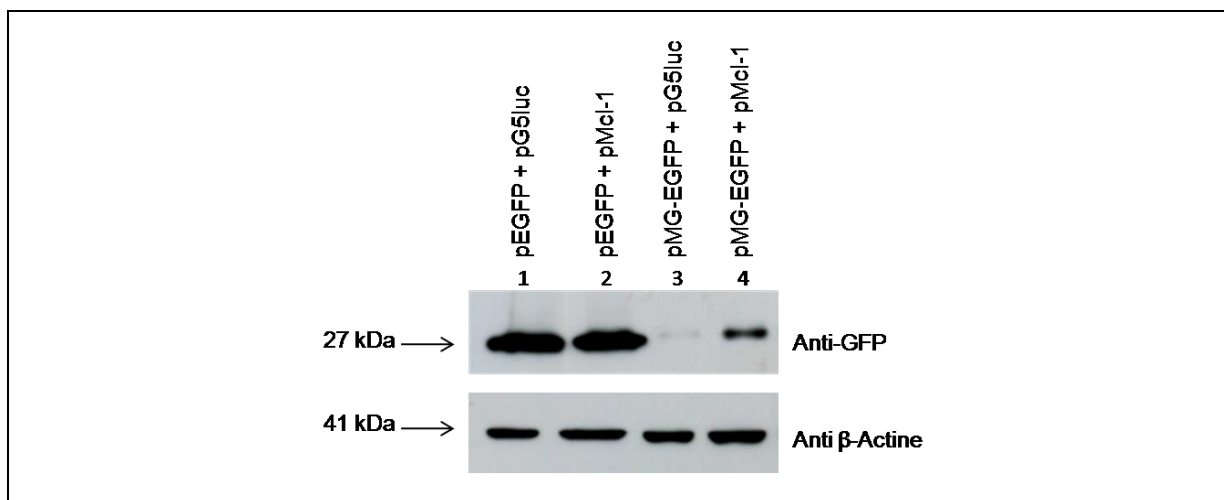


Figure 51 : La surexpression de Mcl-1 autorise l'expression de galig dans la cellule

Cellules HeLa co-transfectées avec les vecteurs codant : $\emptyset$ + l'EGFP (piste 1), Mcl-1 + EGFP (piste 2), $\emptyset$ + la mitogaligine-EGFP (piste 3), Mcl-1 + la mitogaligine-EGFP (piste 4).

pG5luc est un vecteur ne codant aucune protéine, symbolisée par « $\emptyset$ ».

Les extraits cellulaires issus de la lyse de ces cellules 24 h après transfection ont été ensuite analysés par western-blot avec les anticorps anti-GFP (1/ 50 000) et anti- β -actine (1/ 2 000).

II- Diminution de l'expression de Mcl-1 endogène dans les cellules transfectées par galig

Protocole expérimental

Transfection

Les cellules HeLa sont mises en culture 24 heures dans une boîte de 12 puits à raison de $8 \cdot 10^4$ cellules par puits et sur des lamelles. Les cellules sont ensuite transfectées avec 2 μ g d'ADN/puits avec les plasmides suivant :

Tableau 20 : Plasmides utilisés pour étudier l'expression endogène de Mcl-1

Noms des plasmides	Protéines codées
pEGFP	EGFP
pMG-EGFP	Mitogaligine-EGFP

Les cellules sont ensuite fixées et immunomarquées 24 h après transfection (Tableau 21) selon le protocole décrit partie II.

Partie III- Chapitre 1

Expression simultanée de galig et Mcl-1

Immuno-marquages des cellules :

Tableau 21 : Anticorps utilisés en western-blot pour étudier l'expression de Mcl-1 endogène

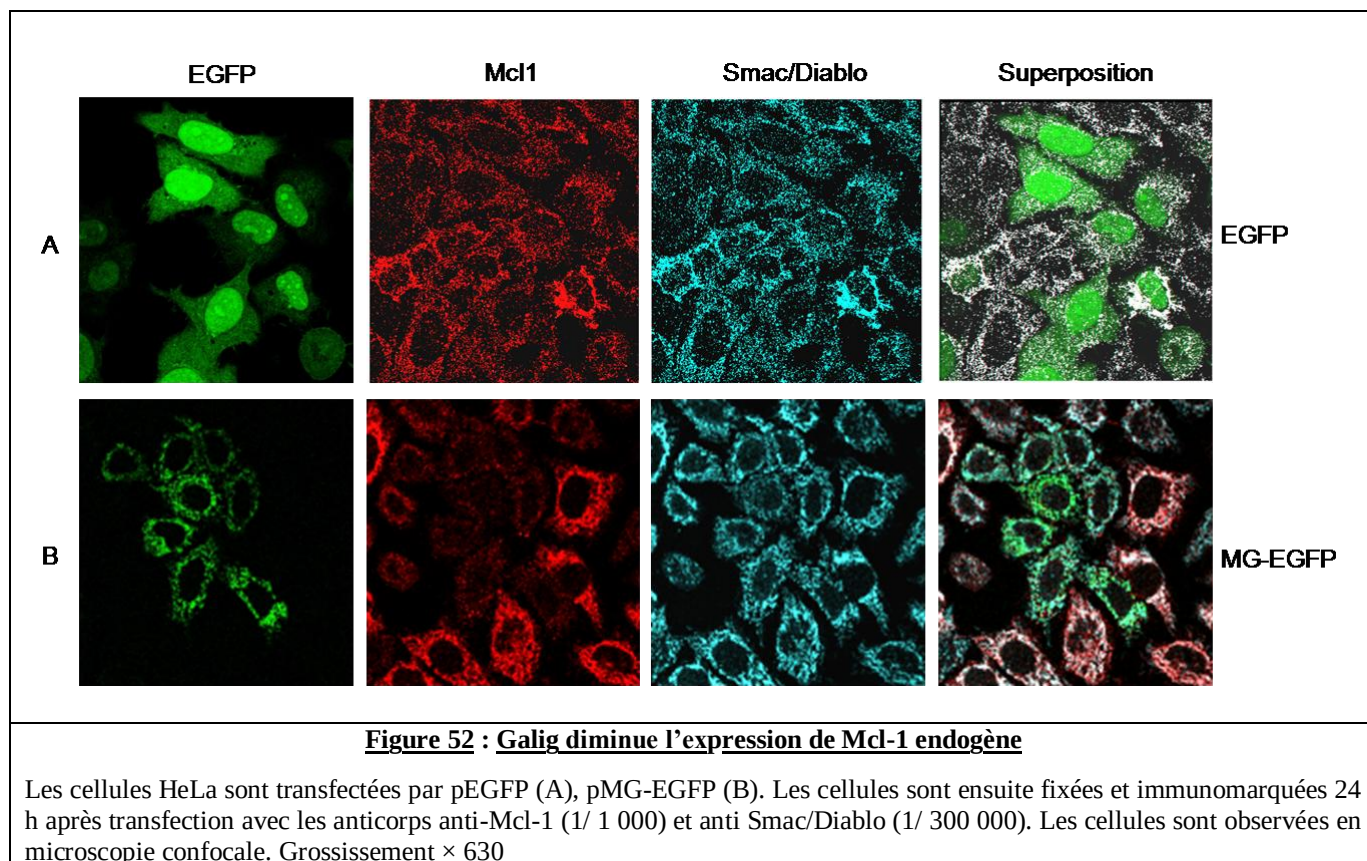
Nature de l'anticorps	Anticorps	Clone	Fournisseur	Dilution
PRIMAIRE	Anti- Mcl-1 (lapin)	Polyclonal	Santa Cruz- SC- 819	1/50
	Anti- Smac/Diablo (souris)	Monoclonal	BD- ref 612244	1/100
SECONDAIRE	Anti-IgG lapin-cyanine 3	Polyclonal	Amersham- ref PA43004	1/ 1 000
	Anti-IgG souris-cyanine 5	Polyclonal	Zymed- ref 81-6516	1/ 100

Résultats

La transfection par le vecteur pEGFP montre la localisation attendue de l'EGFP, la fluorescence verte est diffuse dans le noyau et le cytoplasme (Figure 52). L'expression de Mcl-1 endogène dans les cellules transfectées par pEGFP ne diffère pas par rapport aux cellules non transfectées par pEGFP (ligne A).

Smac/Diablo est une protéine apoptotique mitochondriale qui nous sert de marqueur pour la chimère mitogaligine-EGFP (Colonne Smac/Diablo). Mcl-1 étant également une protéine apoptotique mitochondriale, elle est colocalisée avec Smac/Diablo (ligne A).

La transfection par le vecteur pMG-EGFP (ligne B Figure 52) montre la localisation attendue de la protéine de fusion, à savoir les mitochondries, confirmée par superposition avec la colonne des cellules immunomarquées par l'anticorps anti-Smac. Par comparaison entre les colonnes EGFP et Mcl-1, les cellules qui expriment la mitogaligine-EGFP (fluorescence verte ligne B) montrent une diminution de l'expression de Mcl-1 endogène.



Conclusion

Dans les cellules HeLa transfectées par le gène galig, la quantité de Mcl-1 endogène est diminuée. Nous avons également montré que la surexpression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 s'oppose à l'effet toxique de galig.

Galig et Mcl-1 semblent donc être impliqués dans une voie apoptotique commune.

Chapitre 2 : Interaction mitogaligine/Mcl-1

Dans les deux premières parties de cette étude, nous avons pu montrer que les galigines pouvaient jouer un rôle dans la voie dans laquelle Mcl-1 est impliquée : la voie moléculaire induite par galig peut être contrecarrée par l'action de la protéine anti-apoptotique Mcl-1. De plus, la surexpression de galig diminue l'expression de Mcl-1 endogène.

La plupart des protéines apoptotiques sont régulées par des interactions avec d'autres membres apoptotiques, qu'ils soient pro ou anti-apoptotiques. Nous nous sommes donc intéressés de savoir s'il existe une relation physique entre les deux protagonistes ; mitogaligine et Mcl-1. La technique utilisée pour répondre à cette question est la co-immunoprécipitation.

Les résultats présentés dans ce chapitre résultent **d'expériences préliminaires**. Nous verrons qu'ils soulèvent certains problèmes techniques qui devront être résolus avant d'apporter une conclusion définitive.

 Protocole expérimental

Transfection

Les cellules HeLa sont mises en culture dans une boîte de pétri de 10 cm de diamètre, à raison de $1,8 \cdot 10^6$ cellules par boîte. La co-transfection des cellules s'effectue 24 h après, avec 25 μ g d'ADN (12,5 μ g de chacun des ADN) par boîte (condition de transfection identique à la partie II-Matériels et méthodes) avec les plasmides suivants :

Tableau 22 : Plasmides utilisés pour l'étude de l'interaction galigines/Mcl-1

Noms des plasmides	Protéines de fusions produites
pFlag-Bak + pMcl-1	Flag-Bak
pEGFP + pMcl-1	EGFP
pMG-EGFP + pMcl-1	Mitogaligine-EGFP
pMG ^{T38S39D} -EGFP + pMcl-1	Mitogaligine-EGFP mutée sur les Thr 38 et Ser 39 en Asp

Les cellules transfectées sont ensuite lysées et les extraits protéiques sont immunoprécipités selon le principe représenté Figure 53.

Partie III- Chapitre 2

Interaction mitogaline/Mcl-1

Co-immunoprécipitation

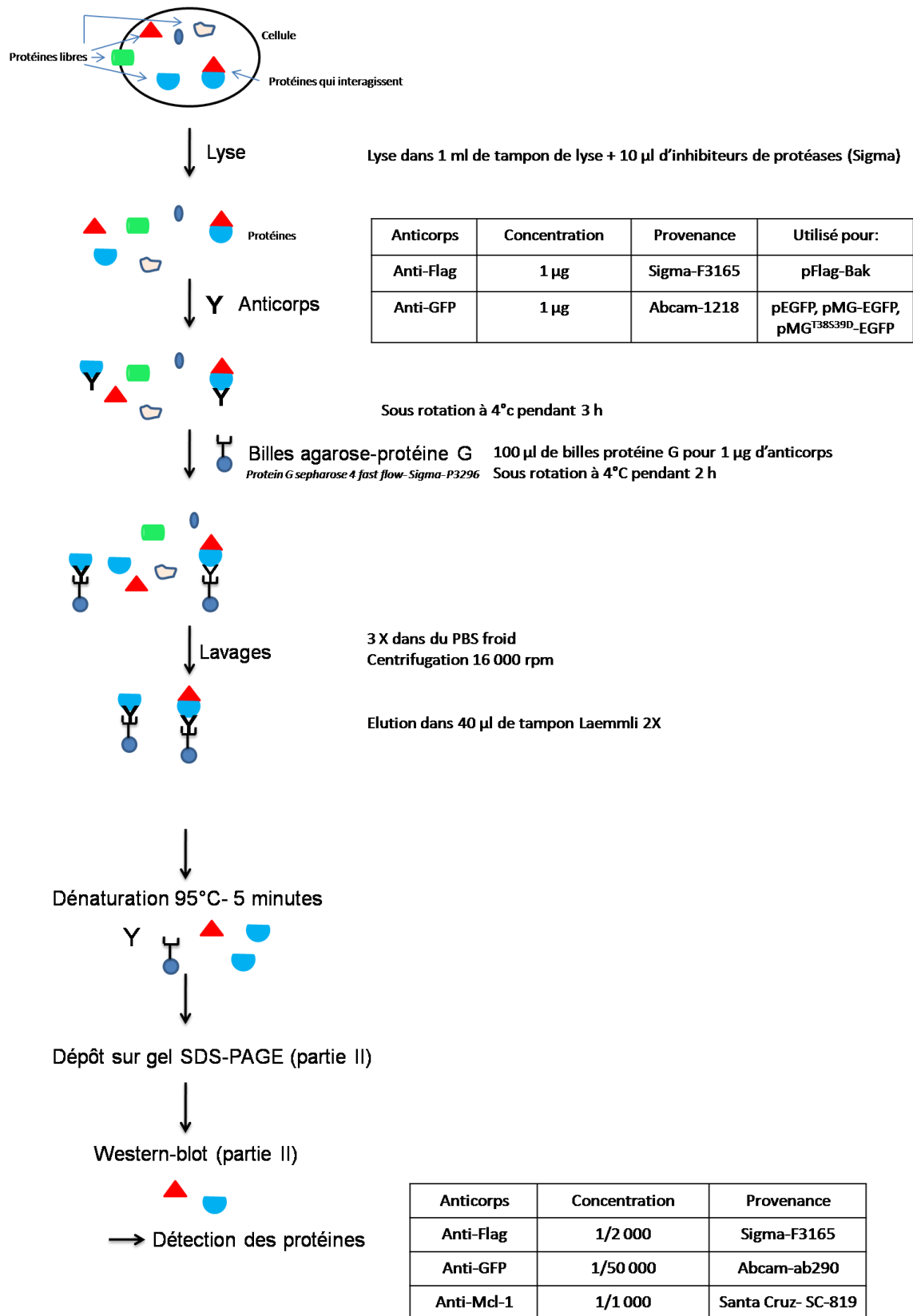


Figure 53 : Principe et protocole de la co-immunoprécipitation des galigines avec Mcl-1

Résultats

Les pistes 1 Figure 54 A et B montrent l'expression de Mcl-1 (piste 1A) ou de Flag-Bak (piste 1B) avant co-immunoprécipitation. La piste 2B représente le témoin de spécificité de l'anticorps immunoprécipitant à savoir l'anti-Flag. Flag-Bak a bien été immunoprécipitée par l'anti-Flag. La piste 2A révèle, comme attendu, la présence de la protéine Mcl-1 après immunoprécipitation de Flag-Bak, témoin de l'interaction entre ces 2 protéines (Cuconati *et al*, 2003).

Les pistes 3B et 4B montrent respectivement la détection de l'EGFP avant et après co-immunoprécipitation par un anticorps anti-GFP. Avant immunoprécipitation, Mcl-1 est détectée dans le lysat cellulaire (piste 3A). En revanche, la présence de Mcl-1 dans l'immunoprécipité anti-GFP est troublante. Même si cette présence est nettement plus faible (piste 4A), le fait d'avoir un signal ne permet pas d'exclure une interaction non spécifique entre l'EGFP et Mcl-1.

Comme attendu pour les cellules cotransfectées par pMcl-1 et pMG-EGFP, l'extrait protéique avant immunoprécipitation contient la forme tronquée de la mitogaligine-EGFP (piste 5B) ainsi que Mcl-1 (piste 5A). L'anticorps anti-GFP a immunoprécipité la mitogaligine-EGFP sous sa forme clivée mais également sous sa forme non-clivée (piste 6B). La présence de Mcl-1 dans l'immunoprécipité de la mitogaligine-EGFP (piste 6A) suppose une interaction entre la mitogaligine et Mcl-1 car la quantité de Mcl-1 détectée est plus importante que celle détectée avec la contrôle négatif (piste 4A).

Les pistes 7 et 8 correspondent aux extraits protéiques issus des cotransfections de cellules HeLa par les vecteurs codant la mitogaligine-EGFP mutée sur la Thr 38 et la Ser 39 en Asp, et Mcl-1. Comme attendu, l'extrait protéique avant immunoprécipitation contient la forme non clivée de la mitogaligine^{T38S39D}-EGFP ainsi que la forme clivée (piste 7B) et Mcl-1 (piste 7A). L'anticorps anti-GFP a bien immunoprécipité la mitogaligine^{T38S39D}-EGFP, sous sa forme clivée ou non (piste 8B). Les résultats sont significativement différents des précédents, l'immunoprécipitation de la mitogaligine^{T38S39D}-EGFP n'a pas entraîné la précipitation de Mcl-1 (piste 8A), l'intensité étant comparable à celle du contrôle (piste 4A).

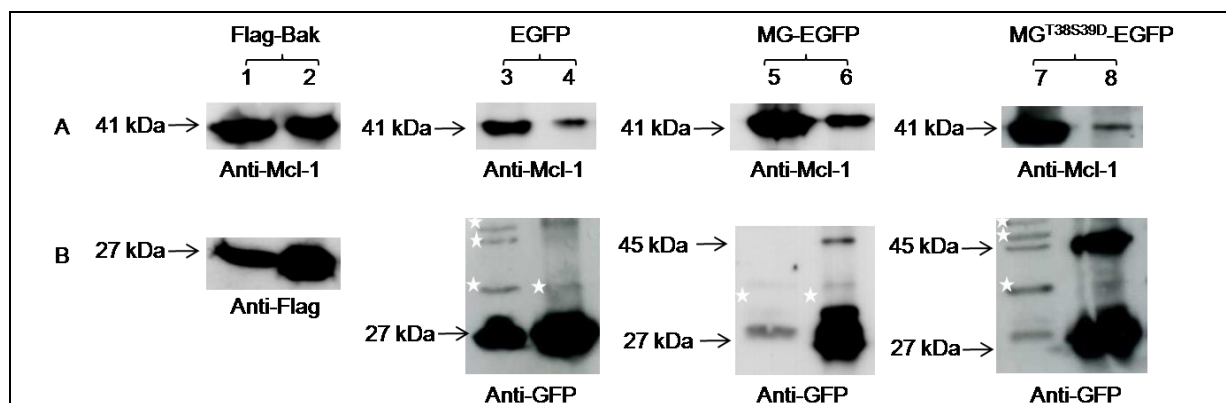


Figure 54 : Expériences de co-immunoprécipitation entre la mitogaligine et Mcl-1

Les cellules HeLa ont été co-transfectées par pMcl-1 et les vecteurs : pFlag-Bak (pistes 1 et 2), pEGFP (pistes 3 et 4), pMG-EGFP (pistes 5 et 6), pMG^{T38S39D}-EGFP (pistes 7 et 8). Les cellules ont été lysées 24 h après transfection. Un échantillon de chaque extrait protéique total est conservé pour témoin avant immunoprécipitation (pistes 1, 3, 5, 7). Les lysats sont ensuite immunoprécipités par les anticorps anti-flag (piste 2) et anti-GFP (pistes 4, 6, 8). Les immunoprécipitations sont ensuite analysées par western-blot avec les anticorps anti-flag (pistes 1B et 2B), anti-GFP (pistes 3B, 4B, 5B, 6B, 7B, 8B), et anti-Mcl-1 (pistes de la ligne A).

Les étoiles blanches indiquent des bandes non spécifiques.

Conclusion

Les résultats vont dans le sens d'une interaction de la mitogaligine mitochondriale avec Mcl-1. La mutation des résidus T38 et S39 mimant une phosphorylation potentielle diminue cette interaction. Ceci pourrait être mis en relation avec la délocalisation de ce mutant de la mitochondrie (Figure 38). En effet, cette hypothèse va dans le sens de l'absence d'interaction entre la mitogaligine nucléaire et Mcl-1 (résultat non montré). L'interaction entre Mcl-1 et la mitogaligine pourrait donc avoir lieu au sein des mitochondries. Néanmoins ces résultats doivent être confirmés. En particulier, il est nécessaire de s'affranchir du problème d'interaction non spécifique entre l'EGFP et Mcl-1 dans le contrôle (piste 4A). Nous mettons actuellement au point une technique de BRET qui pourrait permettre de valider nos résultats.

Conclusions/Discussions/ Perspectives

 Modèle de régulation de la mitogaligine par Mcl-1 (Figure 55)

La surexpression de Mcl-1 bloque la plupart des stimuli apoptotiques et inhibe l'activation de Bax et Bak (Willis *et al*, 2005). La cellule déploie diverses stratégies visant à réduire l'activité de Mcl-1 mais également celle des autres membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. On pose alors la question du rôle des galigines comme élément régulateur. En effet, plusieurs résultats montrent que ces protéines sont impliquées dans une même voie apoptotique. D'une part, la surexpression de Mcl-1 autorise la cellule à exprimer galig, en retardant la mort de la cellule (Figures 50 et 51). D'autre part, la surexpression des galigines diminue l'expression endogène de Mcl-1 (Figure 52). De plus, Mcl-1 pourrait interagir avec la mitogaligine mitochondriale (Figure 54). Cette interaction pourrait avoir lieu au niveau des mitochondries puisque la délocalisation de la mitogaligine mutée sur les résidus thréonine 38 et sérine 39 en aspartate entraîne la perte de cette interaction.

Dans la mesure où la mort cellulaire induite par galig peut être inhibée à la fois par Bcl-X_L et Mcl-1 mais pas Bcl-2, la régulation des galigines et notamment la mitogaligine, pourrait être assimilée à celle de la protéine pro-apoptotique Bak. Dans une cellule saine, Bak est associée à Mcl-1 et Bcl-X_L mais pas Bcl-2. Mcl-1 séquestre Bak par son domaine BH3, domaine nécessaire à son oligomérisation pour induire la mort cellulaire (Cuconati *et al*, 2003). Suite à un stimulus apoptotique, les protéines BH3 sont activées et séparent le complexe Bak-Mcl-1 (Willis *et al*, 2005). A l'image de Bak, on peut donc proposer le modèle de régulation présenté Figure 55 : dans une cellule saine, Mcl-1 pourrait séquestrer la mitogaligine sous une forme phosphorylée sur les résidus T29 et T73 soit une forme non tronquée, donc inactive. Suite à un stimulus apoptotique, la dégradation de Mcl-1 est stimulée par la surexpression de protéines BH3-seulement telles que Noxa. Bak est alors libre de s'oligomériser et d'induire la mort de la cellule (Willis *et al*, 2005). La mitogaligine pourrait également stimuler la dégradation protéique de Mcl-1, ce qui expliquerait que sa surexpression induise la diminution d'expression de Mcl-1 endogène. L'extrémité N-terminale de la mitogaligine serait simultanément dégradée et la mitogaligine deviendrait alors active, entraînant ainsi la dépolarisation de la membrane externe mitochondriale puis la fuite de cytochrome c. D'autre part, la phosphorylation des résidus T38 et S39 pourrait dissocier le complexe mitogaligine-Mcl-1, autorisant la translocation de la mitogaligine au noyau et la dégradation de Mcl-1 par le protéasome. La mitogaligine nucléaire induit alors l'apoptose depuis ce compartiment.

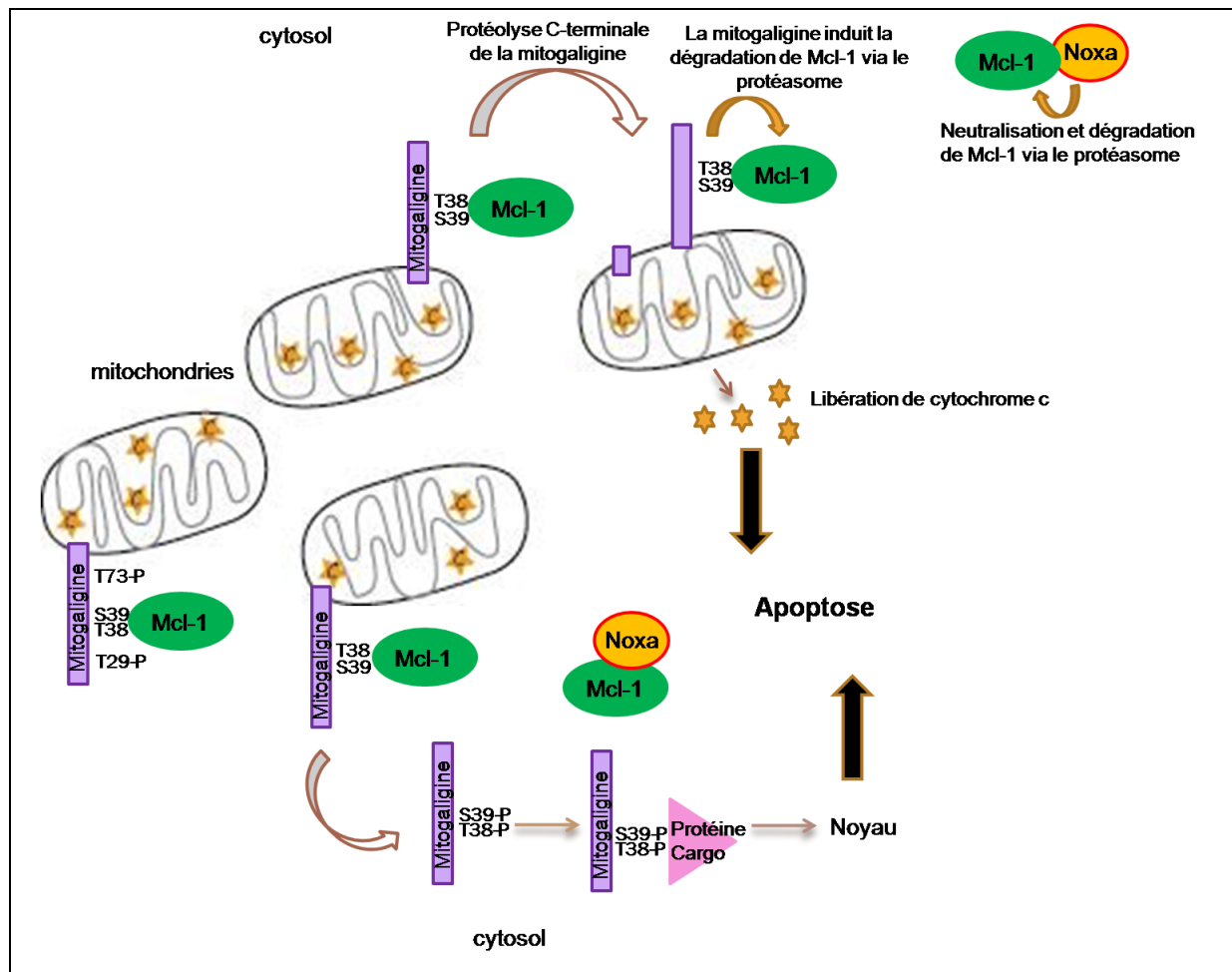


Figure 55 : Modèle de régulation de la mitogaline par ses phosphorylations potentielles

Sous une forme non phosphorylée au niveau des résidus Thr 38 et Ser 39, la mitogaline est localisée au sein des mitochondries et peut interagir avec Mcl-1. La protéolyse de la mitogaline entraîne son activation. A l'image des protéines BH3-seulement telles que Noxa, la mitogaline pourrait alors induire la dégradation protéasomique de Mcl-1. La neutralisation de Mcl-1 et l'activation de facteurs pro-apoptotiques provoquent alors la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale et le relargage de cytochrome c dans le cytosol. La mitogaline phosphorylée sur les résidus Thr 29 et Thr 73 est stable dans les mitochondries. La phosphorylation de ces résidus empêche un clivage par le protéasome. Sous cette forme, la mitogaline reste inactive et peut également se lier à Mcl-1. La phosphorylation des résidus Thr 38 et Ser 39 provoque la délocalisation cytoplasmique de la mitogaline et l'empêche d'interagir avec Mcl-1. Dans le cytosol, la forme phosphorylée transloque vers le noyau par un transporteur inconnu, pour y induire l'apoptose.

La mitogaligine peut-elle être assimilée aux protéines pro-apoptotiques de type Bak/Bax ?

Les galigines sont impliquées dans la voie apoptotique de Bcl-X_L et Mcl-1. La surexpression de ces dernières dans des cellules HeLa diminue la toxicité induite par galig, tandis que la surexpression des galigines diminue l'expression endogène de Mcl-1. La plupart des membres de la famille Bcl-2 sont capables d'interagir ensemble pour activer ou neutraliser leur fonction apoptotique. Les galigines pourraient donc être apparentées aux protéines de la famille Bcl-2 même si aucune homologie de structure n'a été identifiée jusqu'à présent. En effet, certaines protéines virales telle F1L, issue du virus Vaccinia, ne présentant aucune homologie de structure avec les membres de la famille Bcl-2, interagit avec le domaine BH3 de Bak pour empêcher son activation. F1L est donc assimilée à Mcl-1 dans les cellules en infection (Campbell *et al*, 2009). A l'inverse, les galigines pourraient être assimilées à des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2. Il ne serait donc pas étonnant que Bcl-X_L et Mcl-1 régulent la mort cellulaire induite par galig, et plus précisément par la mitogaligine mitochondriale. Cette dernière pourrait être assimilée à Bak/Bax. Cette hypothèse est d'autant plus plausible qu'il est maintenant admis que ces protéines de la famille Bcl-2 interviennent également dans la régulation de voie alternative de la mort cellulaire programmée, dans des voies indépendantes de caspases (Yanagisawa *et al*, 2003). Il serait donc intéressant de savoir si la mitogaligine est susceptible de s'oligomériser ou si elle induit l'activation de Bak ou Bax (Figure 56).

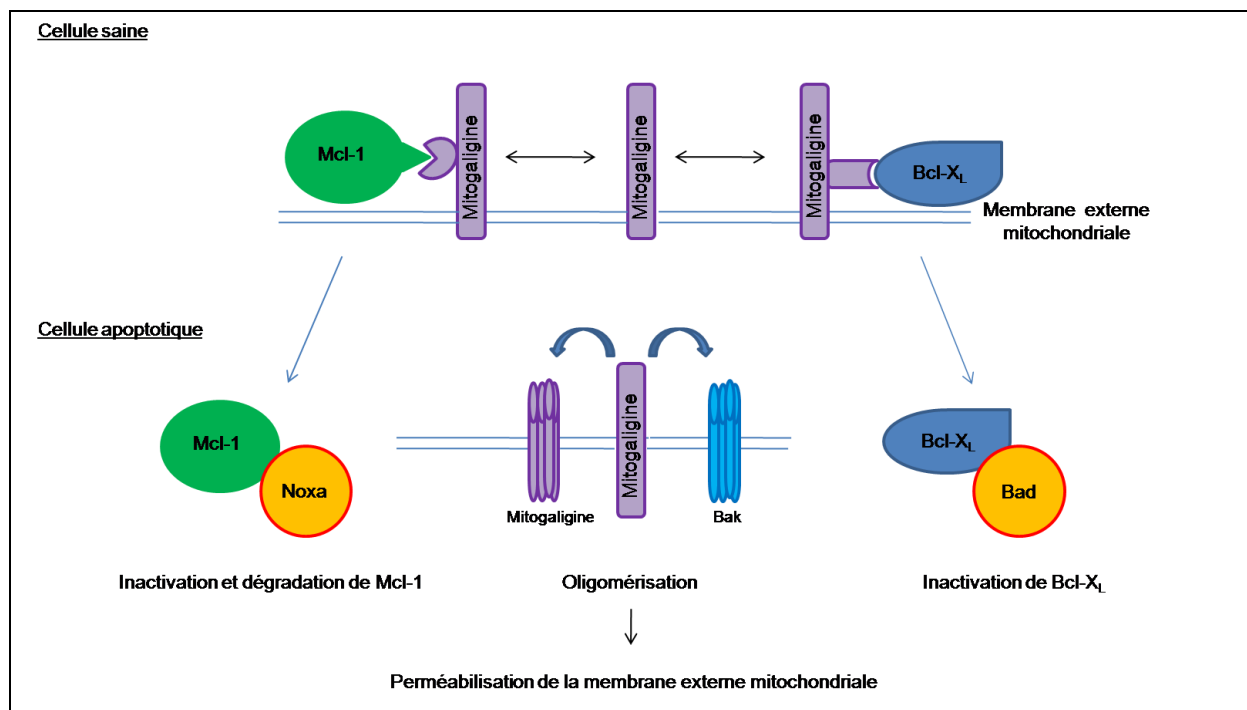


Figure 56 : Modèle de régulation de la mitogaligine par les membres anti-apoptotiques Mcl-1 et Bcl-X_L.

A l'image de Bak, dans une cellule saine, la mitogaligine pourrait être séquestrée dans les mitochondries par les protéines anti-apoptotiques Mcl-1 et Bcl-X_L. Suite à un stimulus apoptotique, l'activation de protéines BH3-seulement telles que Noxa ou Bad, neutralise voire dégrade ces molécules anti-apoptotiques. La mitogaligine est ainsi libre de s'oligomériser ou bien libre d'activer l'oligomérisation de Bak pour perméabiliser la membrane externe mitochondriale et induire la mort de la cellule.

De plus, à l'image de Mcl-1, nous pourrions déterminer si Bcl-X_L interagit physiquement avec la mitogaligine et comment cette interaction est régulée. La surexpression de Bcl-X_L inhibe la libération de cytochrome c induite par l'expression de galig (Duneau *et al*, 2005). Il faudrait alors tester si, comme Bcl-X_L, Mcl-1 empêche le relargage extra-mitochondrial de cytochrome c.

Galig, un espoir thérapeutique ?

Galig, Bcl-X_L et Mcl-1 semblent donc réguler une voie apoptotique commune. Nous avons également montré que la surexpression de galig diminuait l'expression endogène de Mcl-1. Il faudrait alors tester la diminution endogène de Bcl-X_L liée à la surexpression de galig. Cette réponse serait importante car il a été montré, dans des cellules de carcinome ovarien, que Bcl-X_L et Mcl-1 étaient capables de coopérer pour empêcher l'apoptose induite par des agents chimiothérapeutiques (Simonin *et al*, 2009). Galig pourrait alors présenter un potentiel thérapeutique intéressant.

Galig dans la différenciation cellulaire

De nombreuses protéines apoptotiques sont impliquées dans les processus de différenciation cellulaire. Certaines molécules pro-apoptotiques, vont permettre l'activation de caspases particulières, responsables des changements morphologiques de la cellule, sans pour autant provoquer la mort de la cellule (Sordet *et al*, 2002 ; Launay *et al*, 2005 ; Rébé *et al*, 2007). A l'opposé, des molécules anti-apoptotiques vont permettre la survie de la cellule en cours de différenciation. Ce phénomène est qualifié d'apoptose abortive. La régulation de la différenciation versus l'apoptose dépend donc de la présence de protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 telles que Mcl-1 (Kozopas *et al*, 1993 ; Sordet *et al*, 2002). L'expression de Mcl-1 augmente suite à un signal de différenciation cellulaire et diminue suite à un signal apoptotique. Pour accroître son extinction dans les cellules apoptotiques, Mcl-1 est également dégradée *via* le système ubiquitine-protéasome (Michels *et al*, 2005). Des études sont actuellement en cours au laboratoire pour déterminer le rôle de galig et Mcl-1 dans la différenciation des granulocytes en neutrophiles ou monocytes. Les cellules HL60, cellules de leucémie promyélocytique humaine, peuvent, sous l'action du PMA (Phorbol 12 β -myristate 13 α -acétate) ou de la vitamine D3 di-hydroxylée, se différencier en neutrophiles ou monocytes/macrophages. De manière intéressante, l'induction de cette différenciation active l'expression de galig. L'utilisation de siRNA dirigés contre galig et Mcl-1 dans ces cellules HL60 modifie le cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose. Mcl-1 semble jouer un rôle dans l'arrêt de la prolifération des cellules et empêche la différenciation des HL-60 en monocytes/macrophages tandis que galig semble favoriser la différenciation.

Conclusion générale

Les travaux de cette thèse portent sur la régulation de la localisation intracellulaire et de l'activité de la mitogaligine. Ils visent à comprendre comment la mitogaligine s'intègre dans les voies de signalisation de l'apoptose.

Bien que principalement mitochondriale, nos travaux montrent que la mitogaligine possède également une localisation nucléaire. Cette domiciliation secondaire est réalisée grâce à un nouveau type de signal d'adressage nucléaire non conventionnel, basé sur la répétition de séquences peptidiques. Afin de comprendre la régulation de ce trafic intracellulaire, il sera évidemment important de caractériser les partenaires cellulaires de la mitogaligine qui participent à cette translocation vers le noyau.

Qu'elle soit mitochondriale ou nucléaire, la mitogaligine exerce un effet cytotoxique dont les caractéristiques morphologiques et biochimiques sont regroupées dans le tableau 23.

Tableau 23 : Caractéristiques morphologiques et biochimiques de la mort cellulaire induite par la mitogaligine en fonction de sa localisation intracellulaire.

Caractéristiques morphologiques et biochimiques	Mitogaligine mitochondriale	Mitogaligine nucléaire
Bourgeonnement de la membrane plasmique	+	+
Externalisation de la phosphatidylsérine	+	?
Formation de corps apoptotiques	+	+
Condensation des noyaux et mitochondries	+	+
Fragmentation de l'ADN en échelle	-	+
Translocation de Bax à la mitochondrie	+	+
Libération de cytochrome c	+	+
Activation de la caspase-3	-	+

La mitogaligine semble induire la mort cellulaire *via* la voie intrinsèque mitochondriale. Néanmoins selon la localisation de la protéine, la voie d'induction de la mort cellulaire présente certaines disparités (fragmentation de l'ADN en échelle et activation de la caspase-3). La mitogaligine semble donc en mesure d'induire la mort cellulaire selon des voies apoptotiques différentes. L'ensemble de ces données laisse supposer une régulation fine de la protéine. De plus, la mitogaligine mitochondriale fusionnée à l'EGFP est détectée au sein des mitochondries sous une forme clivée contrairement à la protéine de fusion nucléaire. Nous avons montré, que le protéasome pouvait être impliqué dans cette dégradation de la protéine, sans pour autant mettre en évidence une ubiquitinylation potentielle. La mutation des Thr 29 et Thr 73 et des Thr 38 et Ser 39 en résidus phosphomimétiques a montré que la phosphorylation pourrait intervenir dans la régulation de cette protéolyse protéique. Les résidus Thr 29 et Thr 73 seraient également des éléments clés de la fonction de la mitogaligine, puisque leur phosphorylation potentielle entraîne une perte de la cytotoxicité de la protéine. De plus, les acides aminés Thr 38 et Ser 39 pourraient être impliqués dans la régulation de la localisation de la mitogaligine, une phosphorylation potentielle entraînant alors sa délocalisation des mitochondries au profit du noyau et cytoplasme. Ce résultat expliquerait la cytotoxicité de ce vecteur dans les cellules HeLa qui l'expriment. Cependant, il est difficile à l'heure actuelle de savoir si les deux voies de signalisation sont impliquées dans

des interactions fonctionnelles de régulation du processus apoptotique ou si elles sont indépendantes l'une de l'autre.

Outre les modifications post-traductionnelles, nous avons recherché si les membres de la famille Bcl-2, connus pour être des éléments régulateurs de la mort cellulaire programmée, pouvaient influencer sur la mort cellulaire induite par galig. Il apparaît que les protéines anti-apoptotiques Bcl-X_L et Mcl-1 s'opposent à l'effet toxique de galig. De plus, la surexpression de galig diminue la production endogène de Mcl-1. Galig et Mcl-1 ayant une spécificité d'expression dans les monocytes et granulocytes, ces résultats ouvrent donc des perspectives intéressantes sur la régulation du processus apoptotique dans ces cellules.

Les résultats obtenus avec les cellules HeLa devront néanmoins être confirmées dans d'autres modèles cellulaires susceptibles d'exprimer la mitogaligine. En effet, les études réalisées au cours de cette thèse sont basées sur des expériences de surexpression de la protéine. Egalement, l'outil principal reste les protéines de fusion. Ces approches pourraient limiter la significativité des observations réalisées et notamment la surexpression de la protéine pourrait influencer sur son caractère cytotoxique ou sur sa localisation. Néanmoins, il faut prendre en compte que dans les expériences utilisant des mutants ponctuels, la cytotoxicité est indépendante de la quantité de protéine. Par exemple, les mutations des thréonines 29 et 73 en aspartate, sans changer la localisation de la protéine, augmentent sensiblement la quantité de protéine détectée tout en diminuant la cytotoxicité. Ceci laisse supposer que la quantité de protéine n'influence pas l'activité cytotoxique de la mitogaligine. De même, l'utilisation de la protéine reporteur EGFP pourrait moduler la cytotoxicité des galigines. Cependant, des expériences réalisées au laboratoire et utilisant des vecteurs codant des formes non fusionnées des galigines, confirment leurs propriétés cytotoxiques. Un des principaux problèmes rencontrés est la difficulté de détecter la production de la mitogaligine mitochondriale. Cette difficulté est certainement liée au fait que nos anticorps anti-mitogaligine ne sont pas capables de reconnaître la mitogaligine dans la mitochondrie. Ces observations justifient donc notre approche technologique de la surexpression et de l'utilisation de protéines de fusion. Néanmoins, la production d'un nouvel anticorps est indispensable pour les approches *in vivo* de galig.

L'objectif pour le laboratoire étant d'étendre nos connaissances sur la fonction du gène et des galigines *in vivo*, il sera particulièrement intéressant de repérer la production tissulaire et cellulaire de la mitogaligine en s'intéressant plus particulièrement aux cellules leucocytaires. A ce jour, l'expression de la mitogaligine *in vivo* n'a été montrée que dans des cellules hépatocytaires HepG2 (Lehr *et al*, 2005). Il faut noter, dans cette étude, que la surexpression du facteur de transcription SREBP-1A, régulateur du métabolisme lipidique, induit une diminution de la production de mitogaligine mitochondriale.

Etudier l'expression de galig dans différentes pathologies constitue une autre perspective *in vivo* essentielle. Des études pilotes de l'expression de galig dans la polyarthrite rhumatoïde ou dans des tumeurs myéloïdes ont montré des modifications significatives du ratio galig/Mcl-1 (études en cours au laboratoire). De plus, Alsøe et ses collaborateurs ont détecté des anticorps anti-cytogaligine chez un patient atteint d'un cancer de la prostate

(Alsøe *et al*, 2008). Ces résultats préliminaires sont donc prometteurs et incitent à développer les études visant à comprendre les fonctions de ce gène *in vivo*.

Bibliographie

- Adams JM. 2003.** Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes & Development* **17**: 2481-2495.
- Aho TLT, Sandholm J, Peltola KJ, Mankonen HP, Lilly M, Koskinen PJ. 2004.** Pim-1 kinase promotes inactivation of the pro-apoptotic Bad protein by phosphorylating it on the Ser112 gatekeeper site. *FEBS Letters* **571**: 43-49.
- Ajjappala BS, Kim Y, Kim M, Lee M, Lee K, Ki H, Cha D, Baek K. 2009.** 14-3-3 gamma is stimulated by IL-3 and promotes cell proliferation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **182**: 1050-1060.
- Akao Y, Otsuki Y, Kataoka S, Ito Y, Tsujimoto Y. 1994.** Multiple subcellular localization of bcl-2: detection in nuclear outer membrane, endoplasmic reticulum membrane, and mitochondrial membranes. *Cancer Research* **54**: 2468-2471.
- Alsøe L, Stacy JE, Fosså A, Funderud S, Brekke OH, Gaudernack G. 2008.** Identification of prostate cancer antigens by automated high-throughput filter immunoscreening. *Journal of Immunological Methods* **330**:12-23.
- Anderson P. 1997.** Kinase cascades regulating entry into apoptosis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* **61**: 33-46.
- Andrabi SA, Dawson TM, Dawson VL. 2008.** Mitochondrial and nuclear cross talk in cell death: parthanatos. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1147**: 233-241.
- Arden KC, Biggs WH. 2002.** Regulation of the FoxO family of transcription factors by phosphatidylinositol-3 kinase-activated signaling. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **403**: 292-298.
- Asaga H, Yamada M, Senshu T. 1998.** Selective deimination of vimentin in calcium ionophore-induced apoptosis of mouse peritoneal macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **243**: 641-646.
- Asakura T, Maeda K, Omi H, Matsudaira H, Ohkawa K. 2008.** The association of deamidation of Bcl-xL and translocation of Bax to the mitochondria through activation of JNK in the induction of apoptosis by treatment with GSH-conjugated DXR. *International Journal of Oncology* **33**: 389-395.
- Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P, Wright JJ, McBride OW, Epstein AL, Korsmeyer SJ. 1985.** Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* **41**: 899-906.
- Barnhart BC, Alappat EC, Peter ME. 2003.** The CD95 type I/type II model. *Seminars in Immunology* **15**: 185-193.
- Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H. 1994.** Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *The Journal of Biological Chemistry* **269**: 20807-20810.
- Barry M, Heibei JA, Pinkoski MJ, Lee SF, Moyer RW, Green DR, Bleackley RC. 2000.** Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. *Molecular and Cellular Biology* **20**: 3781-3794.
- Bartholomeusz G, Wu Y, Ali Seyed M, Xia W, Kwong K, Hortobagyi G, Hung M. 2006.** Nuclear translocation of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bok induces apoptosis. *Molecular Carcinogenesis* **45**: 73-83.

- Bassik MC, Scorrano L, Oakes SA, Pozzan T, Korsmeyer SJ. 2004.** Phosphorylation of BCL-2 regulates ER Ca²⁺ homeostasis and apoptosis. *The EMBO Journal* **23**: 1207-1216.
- Beauchamp E, Tekpli X, Marteil G, Lagadic-Gossmann D, Legrand P, Rioux V. 2009.** N-Myristoylation targets dihydroceramide Delta4-desaturase 1 to mitochondria: partial involvement in the apoptotic effect of myristic acid. *Biochimie* **91**: 1411-1419.
- Bellamy W, Takase M, Yamauchi K, Wakabayashi H, Kawase K, Tomita M. 1992.** Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1121**: 130-136.
- Berridge MJ. 1993.** Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**: 315-325.
- Berridge MJ. 2001.** The versatility and complexity of calcium signalling. *Novartis Foundation Symposium* **239**: 52-64; discussion 64-67, 150-159.
- Bhardwaj A, Aggarwal BB. 2003.** Receptor-mediated choreography of life and death. *Journal of Clinical Immunology* **23**: 317-332.
- Bihlmaier K, Mesecke N, Kloeppel C, Herrmann JM. 2008.** The disulfide relay of the intermembrane space of mitochondria: an oxygen-sensing system? *Annals of the New York Academy of Sciences* **1147**: 293-302.
- Billen LP, Shamas-Din A, Andrews DW. 2008.** Bid: a Bax-like BH3 protein. *Oncogene* **27 Suppl 1**: S93-104.
- Birnboim HC, Doly J. 1979.** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **7**: 1513-1523.
- Blume-Jensen P, Janknecht R, Hunter T. 1998.** The kit receptor promotes cell survival via activation of PI 3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136. *Current Biology: CB* **8**: 779-782.
- Borner C. 1996.** Diminished cell proliferation associated with the death-protective activity of Bcl-2. *The Journal of Biological Chemistry* **271**: 12695-12698.
- Brameier M, Krings A, MacCallum RM. 2007.** NucPred--predicting nuclear localization of proteins. *Bioinformatics (Oxford, England)* **23**: 1159-1160.
- Brancolini C, Lazarevic D, Rodriguez J, Schneider C. 1997.** Dismantling cell-cell contacts during apoptosis is coupled to a caspase-dependent proteolytic cleavage of beta-catenin. *The Journal of Cell Biology* **139**: 759-771.
- Breitschopf K, Haendeler J, Malchow P, Zeiher AM, Dimmeler S. 2000.** Posttranslational modification of Bcl-2 facilitates its proteasome-dependent degradation: molecular characterization of the involved signaling pathway. *Molecular and Cellular Biology* **20**: 1886-1896.
- Brotin E, Meryet-Figuière M, Simonin K, Duval RE, Villedieu M, Leroy-Dudal J, Saison-Behmoaras E, Gauduchon P, Denoyelle C, Poulain L. 2010.** Bcl-XL and MCL-1 constitute pertinent targets in ovarian carcinoma and their concomitant inhibition is sufficient to induce apoptosis. *International Journal of Cancer* **126**: 885-895.
- Brunelle JK, Ryan J, Yecies D, Opferman JT, Letai A. 2009.** MCL-1-dependent leukemia cells are more sensitive to chemotherapy than BCL-2-dependent counterparts. *The Journal of Cell Biology* **187**: 429-442.
- Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME. 1999.** Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**: 857-868.

- Burri L, Strahm Y, Hawkins CJ, Gentle IE, Puryear MA, Verhagen A, Callus B, Vaux D, Lithgow T. 2005.** Mature DIABLO/Smac is produced by the IMP protease complex on the mitochondrial inner membrane. *Molecular Biology of the Cell* **16**: 2926-2933.
- Cadwell K, Coscoy L. 2005.** Ubiquitination on nonlysine residues by a viral E3 ubiquitin ligase. *Science (New York, N.Y.)* **309**: 127-130.
- Campbell S, Hazes B, Kvensakul M, Colman P, Barry M. 2010.** Vaccinia virus F1L interacts with Bak using highly divergent Bcl-2 homology domains and replaces the function of Mcl-1. *The Journal of Biological Chemistry* **285**: 4695-4708.
- Cao X, Liu W, Lin F, Li H, Kolluri SK, Lin B, Han Y, Dawson MI, Zhang X. 2004.** Retinoid X receptor regulates Nur77/TR3-dependent apoptosis [corrected] by modulating its nuclear export and mitochondrial targeting. *Molecular and Cellular Biology* **24**: 9705-9725.
- Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC. 1998.** Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science (New York, N.Y.)* **282**: 1318-1321.
- Casciola-Rosen LA, Anhalt GJ, Rosen A. 1995.** DNA-dependent protein kinase is one of a subset of autoantigens specifically cleaved early during apoptosis. *The Journal of Experimental Medicine* **182**: 1625-1634.
- Castedo M, Perfettini J, Roumier T, Kroemer G. 2002.** Cyclin-dependent kinase-1: linking apoptosis to cell cycle and mitotic catastrophe. *Cell Death and Differentiation* **9**: 1287-1293.
- Cazalla D, Zhu J, Manche L, Huber E, Krainer AR, Cáceres JF. 2002.** Nuclear export and retention signals in the RS domain of SR proteins. *Molecular and Cellular Biology* **22**: 6871-6882.
- Chami M, Prandini A, Campanella M, Pinton P, Szabadkai G, Reed JC, Rizzuto R. 2004.** Bcl-2 and Bax exert opposing effects on Ca²⁺ signaling, which do not depend on their putative pore-forming region. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 54581-54589.
- Chau V, Tobias JW, Bachmair A, Marriott D, Ecker DJ, Gonda DK, Varshavsky A. 1989.** A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science (New York, N.Y.)* **243**: 1576-1583.
- Chen C, Edelstein LC, Gélinas C. 2000.** The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L). *Molecular and Cellular Biology* **20**: 2687-2695.
- Chen H, Zhao B, Zhao W, Li L, Zhang B, Wu Q. 2008.** Akt phosphorylates the TR3 orphan receptor and blocks its targeting to the mitochondria. *Carcinogenesis* **29**: 2078-2088.
- Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JL, Hinds MG, Colman PM, Day CL, Adams JM, Huang DCS. 2005.** Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Molecular Cell* **17**: 393-403.
- Chen MC, Gong HY, Cheng CY, Wang JP, Hong JR, Wu JL. 2000.** Cloning and characterization of a novel nuclear Bcl-2 family protein, zfMcl-1a, in zebrafish embryo. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **279**: 725-731.
- Cheng EH, Kirsch DG, Clem RJ, Ravi R, Kastan MB, Bedi A, Ueno K, Hardwick JM. 1997.** Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science (New York, N.Y.)* **278**: 1966-1968.
- Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, Korsmeyer SJ. 2001.** BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Molecular Cell* **8**: 705-711.

- Cheng EHY, Sheiko TV, Fisher JK, Craigen WJ, Korsmeyer SJ. 2003.** VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science (New York, N.Y.)* **301**: 513-517.
- Cherayil BJ, Chaitovitz S, Wong C, Pillai S. 1990.** Molecular cloning of a human macrophage lectin specific for galactose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 7324-7328.
- Cheung WL, Ajiro K, Samejima K, Kloc M, Cheung P, Mizzen CA, Beeser A, Etkin LD, Chernoff J, Earnshaw WC, Allis CD. 2003.** Apoptotic phosphorylation of histone H2B is mediated by mammalian sterile twenty kinase. *Cell* **113**: 507-517.
- Chiang C, Kanies C, Kim KW, Fang WB, Parkhurst C, Xie M, Henry T, Yang E. 2003.** Protein phosphatase 2A dephosphorylation of phosphoserine 112 plays the gatekeeper role for BAD-mediated apoptosis. *Molecular and Cellular Biology* **23**: 6350-6362.
- Chipuk JE, Green DR. 2008.** How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends in Cell Biology* **18**: 157-164.
- Clarke PG, Clarke S. 1996.** Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. *Anatomy and Embryology* **193**: 81-99.
- Clohessy JG, Zhuang J, de Boer J, Gil-Gómez G, Brady HJM. 2006.** Mcl-1 interacts with truncated Bid and inhibits its induction of cytochrome c release and its role in receptor-mediated apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* **281**: 5750-5759.
- Condorelli F, Salomoni P, Cotteret S, Cesi V, Srinivasula SM, Alnemri ES, Calabretta B. 2001.** Caspase cleavage enhances the apoptosis-inducing effects of BAD. *Molecular and Cellular Biology* **21**: 3025-3036.
- Conti E, Kuriyan J. 2000.** Crystallographic analysis of the specific yet versatile recognition of distinct nuclear localization signals by karyopherin alpha. *Structure (London, England: 1993)* **8**: 329-338.
- Conti E, Uy M, Leighton L, Blobel G, Kuriyan J. 1998.** Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. *Cell* **94**: 193-204.
- Cotteret S, Chernoff J. 2006.** Nucleocytoplasmic shuttling of Pak5 regulates its antiapoptotic properties. *Molecular and Cellular Biology* **26**: 3215-3230.
- Cotteret S, Jaffer ZM, Beeser A, Chernoff J. 2003.** p21-Activated kinase 5 (Pak5) localizes to mitochondria and inhibits apoptosis by phosphorylating BAD. *Molecular and Cellular Biology* **23**: 5526-5539.
- Creagh EM, Murphy BM, Duriez PJ, Duckett CS, Martin SJ. 2004.** Smac/Diablo antagonizes ubiquitin ligase activity of inhibitor of apoptosis proteins. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 26906-26914.
- Criddle DN, Gerasimenko JV, Baumgartner HK, Jaffar M, Voronina S, Sutton R, Petersen OH, Gerasimenko OV. 2007.** Calcium signalling and pancreatic cell death: apoptosis or necrosis? *Cell Death and Differentiation* **14**: 1285-1294.
- Cristea IM, Degli Esposti M. 2004.** Membrane lipids and cell death: an overview. *Chemistry and Physics of Lipids* **129**: 133-160.
- Csordás G, Madesh M, Antonsson B, Hajnóczky G. 2002.** tcBid promotes Ca(2+) signal propagation to the mitochondria: control of Ca(2+) permeation through the outer mitochondrial membrane. *The EMBO Journal* **21**: 2198-2206.

- Cuconati A, Mukherjee C, Perez D, White E. 2003.** DNA damage response and MCL-1 destruction initiate apoptosis in adenovirus-infected cells. *Genes & Development* **17**: 2922-2932.
- Danial NN. 2009.** BAD: undertaker by night, candyman by day. *Oncogene* **27 Suppl 1**: S53-70.
- Danial NN, Gramm CF, Scorrano L, Zhang C, Krauss S, Ranger AM, Datta SR, Greenberg ME, Licklider LJ, Lowell BB, Gygi SP, Korsmeyer SJ. 2003.** BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature* **424**: 952-956.
- Darmon AJ, Nicholson DW, Bleackley RC. 1995.** Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature* **377**: 446-448.
- Datta SR, Katsov A, Hu L, Petros A, Fesik SW, Yaffe MB, Greenberg ME. 2000.** 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Molecular Cell* **6**: 41-51.
- Datta SR, Ranger AM, Lin MZ, Sturgill JF, Ma Y, Cowan CW, Dikkes P, Korsmeyer SJ, Greenberg ME. 2002.** Survival factor-mediated BAD phosphorylation raises the mitochondrial threshold for apoptosis. *Developmental Cell* **3**: 631-643.
- Daugas E, Nochy D, Ravagnan L, Loeffler M, Susin SA, Zamzami N, Kroemer G. 2000.** Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Letters* **476**: 118-123.
- Day CL, Smits C, Fan FC, Lee EF, Fairlie WD, Hinds MG. 2008.** Structure of the BH3 domains from the p53-inducible BH3-only proteins Noxa and Puma in complex with Mcl-1. *Journal of Molecular Biology* **380**: 958-971.
- Degli Esposti M, Ferry G, Masdehors P, Boutin JA, Hickman JA, Dive C. 2003.** Post-translational modification of Bid has differential effects on its susceptibility to cleavage by caspase 8 or caspase 3. *The Journal of Biological Chemistry* **278**: 15749-15757.
- van Delft MF, Wei AH, Mason KD, Vandenberg CJ, Chen L, Czabotar PE, Willis SN, Scott CL, Day CL, Cory S, Adams JM, Roberts AW, Huang DCS. 2006.** The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer Cell* **10**: 389-399.
- Desagher S, Osen-Sand A, Montessuit S, Magnenat E, Vilbois F, Hochmann A, Journot L, Antonsson B, Martinou JC. 2001.** Phosphorylation of bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8. *Molecular Cell* **8**: 601-611.
- Desagher S, Martinou JC. 2000.** Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends in Cell Biology* **10**: 369-377.
- Desterro JM, Rodriguez MS, Hay RT. 1998.** SUMO-1 modification of IkappaBalpha inhibits NF-kappaB activation. *Molecular Cell* **2**: 233-239.
- Deverman BE, Cook BL, Manson SR, Niederhoff RA, Langer EM, Rosová I, Kulans LA, Fu X, Weinberg JS, Heinecke JW, Roth KA, Weintraub SJ. 2002.** Bcl-xL deamidation is a critical switch in the regulation of the response to DNA damage. *Cell* **111**: 51-62.
- Diehl JA, Zindy F, Sherr CJ. 1997.** Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes & Development* **11**: 957-972.
- Dijkers PF, Medema RH, Pals C, Banerji L, Thomas NS, Lam EW, Burgering BM, Raaijmakers JA, Lammers JW, Koenderman L, Coffey PJ. 2000.** Forkhead transcription factor FKHR-L1 modulates cytokine-dependent transcriptional regulation of p27(KIP1). *Molecular and Cellular Biology* **20**: 9138-9148.

- Dimmeler S, Breitschopf K, Haendeler J, Zeiher AM. 1999.** Dephosphorylation targets Bcl-2 for ubiquitin-dependent degradation: a link between the apoptosome and the proteasome pathway. *The Journal of Experimental Medicine* **189**: 1815-1822.
- Dingwall C, Sharnick SV, Laskey RA. 1982.** A polypeptide domain that specifies migration of nucleoplasmin into the nucleus. *Cell* **30**: 449-458.
- Ditzel M, Meier P. 2005.** Ubiquitylation in apoptosis: DIAP1's (N-)enigma. *Cell Death and Differentiation* **12**: 1208-1212.
- Domina AM, Vrana JA, Gregory MA, Hann SR, Craig RW. 2004.** MCL1 is phosphorylated in the PEST region and stabilized upon ERK activation in viable cells, and at additional sites with cytotoxic okadaic acid or taxol. *Oncogene* **23**: 5301-5315.
- Donovan N, Becker EBE, Konishi Y, Bonni A. 2002.** JNK phosphorylation and activation of BAD couples the stress-activated signaling pathway to the cell death machinery. *The Journal of Biological Chemistry* **277**: 40944-40949.
- Draetta G, Beach D. 1988.** Activation of cdc2 protein kinase during mitosis in human cells: cell cycle-dependent phosphorylation and subunit rearrangement. *Cell* **54**: 17-26.
- Du J, Wei N, Xu H, Ge Y, Vásquez-Vivar J, Guan T, Oldham KT, Pritchard KA, Shi Y. 2009.** Identification and functional characterization of phosphorylation sites on GTP cyclohydrolase I. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **29**: 2161-2168.
- Du L, Lyle CS, Chambers TC. 2005.** Characterization of vinblastine-induced Bcl-xL and Bcl-2 phosphorylation: evidence for a novel protein kinase and a coordinated phosphorylation/dephosphorylation cycle associated with apoptosis induction. *Oncogene* **24**: 107-117.
- Duneau M. 2005.** GALIG : Un nouveau gène humain inducteur de la mort cellulaire. Thèse Université d'Orléans.
- Duneau M, Boyer-Guittaut M, Gonzalez P, Charpentier S, Normand T, Dubois M, Raimond J, Legrand A. 2005.** Galig, a novel cell death gene that encodes a mitochondrial protein promoting cytochrome c release. *Experimental Cell Research* **302**: 194-205.
- Dusek RL, Getsios S, Chen F, Park JK, Amargo EV, Cryns VL, Green KJ. 2006.** The differentiation-dependent desmosomal cadherin desmoglein 1 is a novel caspase-3 target that regulates apoptosis in keratinocytes. *The Journal of Biological Chemistry* **281**: 3614-3624.
- Duvall E, Wyllie AH. 1986.** Death and the cell. *Immunology Today* **7**: 115-119.
- Dzhagalov I, St John A, He Y. 2007.** The antiapoptotic protein Mcl-1 is essential for the survival of neutrophils but not macrophages. *Blood* **109**: 1620-1626.
- Eguchi K. 2001.** Apoptosis in autoimmune diseases. *Internal Medicine (Tokyo, Japan)* **40**: 275-284.
- Elmore S. 2007.** Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* **35**: 495-516.
- Falla TJ, Karunaratne DN, Hancock RE. 1996.** Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin. *The Journal of Biological Chemistry* **271**: 19298-19303.
- Fang S, Weissman AM. 2004.** A field guide to ubiquitylation. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* **61**: 1546-1561.

- Fearon WR. 1939.** The carbamido diacetyl reaction: a test for citrulline. *The Biochemical Journal* **33**: 902-907.
- Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. 2006.** Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochimica e Biophysica Acta* **1757**: 1371-1387.
- Finley D, Bartel B, Varshavsky A. 1989.** The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis. *Nature* **338**: 394-401.
- Fleury C, Mignotte B, Vayssi re J. 2002.** Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie* **84**: 131-141.
- Fontes MR, Teh T, Kobe B. 2000.** Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin- . *Journal of Molecular Biology* **297**: 1183-1194.
- Friedman J, Xue D. 2004.** To live or die by the sword: the regulation of apoptosis by the proteasome. *Developmental Cell* **6**: 460-461.
- Fueller J, Becker M, Sienierth AR, Fischer A, Hotz C, Galmiche A. 2008.** C-Raf activation promotes BAD poly-ubiquitylation and turn-over by the proteasome. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **370**: 552-556.
- Fujise K, Zhang D, Liu J, Yeh ET. 2000.** Regulation of apoptosis and cell cycle progression by MCL1. Differential role of proliferating cell nuclear antigen. *The Journal of Biological Chemistry* **275**: 39458-39465.
- Galluzzi L, Joza N, Tasdemir E, Maiuri MC, Hengartner M, Abrams JM, Tavernarakis N, Penninger J, Madeo F, Kroemer G. 2008.** No death without life: vital functions of apoptotic effectors. *Cell Death and Differentiation* **15**: 1113-1123.
- Gardai SJ, Hildeman DA, Frankel SK, Whitlock BB, Frasch SC, Borregaard N, Marrack P, Bratton DL, Henson PM. 2004.** Phosphorylation of Bax Ser184 by Akt regulates its activity and apoptosis in neutrophils. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 21085-21095.
- Gasiorowski JZ, Dean DA. 2003.** Mechanisms of nuclear transport and interventions. *Advanced Drug Delivery Reviews* **55**: 703-716.
- Gavathiotis E, Suzuki M, Davis ML, Pitter K, Bird GH, Katz SG, Tu H, Kim H, Cheng EH, Tjandra N, Walensky LD. 2008.** BAX activation is initiated at a novel interaction site. *Nature* **455**: 1076-1081.
- Geiss-Friedlander R, Melchior F. 2007.** Concepts in sumoylation: a decade on. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **8**: 947-956.
- Germain D. 2008.** Ubiquitin-dependent and -independent mitochondrial protein quality controls: implications in ageing and neurodegenerative diseases. *Molecular Microbiology* **70**: 1334-1341.
- Germain M, Mathai JP, Shore GC. 2002.** BH-3-only BIK functions at the endoplasmic reticulum to stimulate cytochrome c release from mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry* **277**: 18053-18060.
- Ghaemmaghami S, Huh W, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephoure N, O'Shea EK, Weissman JS. 2003.** Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* **425**: 737-741.
- Giam M, Huang DCS, Bouillet P. 2008.** BH3-only proteins and their roles in programmed cell death. *Oncogene* **27 Suppl 1**: S128-136.

- Gill G. 2005.** Something about SUMO inhibits transcription. *Current Opinion in Genetics & Development* **15**: 536-541.
- Gill MB, Bockhorst K, Narayana P, Perez-Polo JR. 2008.** Bax shuttling after neonatal hypoxia-ischemia: hyperoxia effects. *Journal of Neuroscience Research* **86**: 3584-3604.
- Gillissen B, Essmann F, Graupner V, Stärck L, Radetzki S, Dörken B, Schulze-Osthoff K, Daniel PT. 2003.** Induction of cell death by the BH3-only Bcl-2 homolog Nbk/Bik is mediated by an entirely Bax-dependent mitochondrial pathway. *The EMBO Journal* **22**: 3580-3590.
- Gingras AC, Kennedy SG, O'Leary MA, Sonenberg N, Hay N. 1998.** 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes & Development* **12**: 502-513.
- Gomez-Bougie P, Oliver L, Le Gouill S, Bataille R, Amiot M. 2005.** Melphalan-induced apoptosis in multiple myeloma cells is associated with a cleavage of Mcl-1 and Bim and a decrease in the Mcl-1/Bim complex. *Oncogene* **24**: 8076-8079.
- Gonzalez P. 2007.** Aspects moléculaires et cellulaires de l'activité cytotoxique de la mitogaligine, une protéine inductrice de la mort cellulaire. Thèse Université d'Orléans.
- Gonzalez P, Duneau M, Charpentier S, Normand T, Mollet L, Dubois M, Legrand A. 2007.** Destabilization of membranes containing cardiolipin or its precursors by peptides derived from mitogaligin, a cell death protein. *Biochemistry* **46**: 7374-7382.
- Gonzalez P, Robinet P, Charpentier S, Mollet L, Normand T, Dubois M, Legrand A. 2009.** Apoptotic activity of a nuclear form of mitogaligin, a cell death protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **378**: 816-820.
- Gordon JI, Duronio RJ, Rudnick DA, Adams SP, Gokel GW. 1991.** Protein N-myristoylation. *The Journal of Biological Chemistry* **266**: 8647-8650.
- Görlich D, Henklein P, Laskey RA, Hartmann E. 1996.** A 41 amino acid motif in importin-alpha confers binding to importin-beta and hence transit into the nucleus. *The EMBO Journal* **15**: 1810-1817.
- Grammaticos PC, Diamantis A. 2008.** Useful known and unknown views of the father of modern medicine, Hippocrates and his teacher Democritus. *Hellenic Journal of Nuclear Medicine* **11**: 2-4.
- Greenberg ME, Sun M, Zhang R, Febbraio M, Silverstein R, Hazen SL. 2006.** Oxidized phosphatidylserine-CD36 interactions play an essential role in macrophage-dependent phagocytosis of apoptotic cells. *The Journal of Experimental Medicine* **203**: 2613-2625.
- Grinberg M, Sarig R, Zaltsman Y, Frumkin D, Grammatikakis N, Reuveny E, Gross A. 2002.** tBID Homooligomerizes in the mitochondrial membrane to induce apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* **277**: 12237-12245.
- Guittaut M. 2001.** Mise en évidence et caractérisation d'un gène cytotoxique emboîté dans le gène de la Galectine-3 humaine. Thèse Université d'Orléans.
- Guittaut M, Charpentier S, Normand T, Dubois M, Raimond J, Legrand A. 2001.** Identification of an internal gene to the human Galectin-3 gene with two different overlapping reading frames that do not encode Galectin-3. *The Journal of Biological Chemistry* **276**: 2652-2657.

Gurbuxani S, Schmitt E, Cande C, Parcellier A, Hammann A, Daugas E, Kouranti I, Spahr C, Pance A, Kroemer G, Garrido C. 2003. Heat shock protein 70 binding inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor. *Oncogene* **22**: 6669-6678.

van Gurp M, Festjens N, van Loo G, Saelens X, Vandenabeele P. 2003. Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **304**: 487-497.

György B, Tóth E, Tarcsa E, Falus A, Buzás EI. 2006. Citrullination: a posttranslational modification in health and disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **38**: 1662-1677.

Haldar S, Chintapalli J, Croce CM. 1996. Taxol induces bcl-2 phosphorylation and death of prostate cancer cells. *Cancer Research* **56**: 1253-1255.

Han Y, Cao X, Lin B, Lin F, Kolluri SK, Stebbins J, Reed JC, Dawson MI, Zhang X. 2006. Regulation of Nur77 nuclear export by c-Jun N-terminal kinase and Akt. *Oncogene* **25**: 2974-2986.

Harada N, Hatano E, Koizumi N, Nitta T, Yoshida M, Yamamoto N, Brenner DA, Yamaoka Y. 2004. Akt activation protects rat liver from ischemia/reperfusion injury. *The Journal of Surgical Research* **121**: 159-170.

Hardeland U, Steinacher R, Jiricny J, Schär P. 2002. Modification of the human thymine-DNA glycosylase by ubiquitin-like proteins facilitates enzymatic turnover. *The EMBO Journal* **21**: 1456-1464.

Hatahet F, Ruddock LW. 2009. Protein disulfide isomerase: a critical evaluation of its function in disulfide bond formation. *Antioxidants & Redox Signaling* **11**: 2807-2850.

Hay RT, Vuillard L, Desterro JM, Rodriguez MS. 1999. Control of NF-kappa B transcriptional activation by signal induced proteolysis of I kappa B alpha. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **354**: 1601-1609.

Hedge AN, Inokuchi K, Pei W, Casaido A, Ghirardi M, Chain DG, Martin KC, Kandel ER, Schwartz JH. 1997. Ubiquitin C-terminal hydrolase is an immediate-early gene essential for long-term facilitation in Aplysia. *Cell* **89**: 115-126

Hekman M, Albert S, Galmiche A, Rennefahrt UEE, Fueller J, Fischer A, Puehringer D, Wiese S, Rapp UR. 2006. Reversible membrane interaction of BAD requires two C-terminal lipid binding domains in conjunction with 14-3-3 protein binding. *The Journal of Biological Chemistry* **281**: 17321-17336.

Henderson CJ, Aleo E, Fontanini A, Maestro R, Paroni G, Brancolini C. 2005. Caspase activation and apoptosis in response to proteasome inhibitors. *Cell Death and Differentiation* **12**: 1240-1254.

Hengartner MO. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**: 770-776.

Henshall DC, Araki T, Schindler CK, Lan J, Tiekoter KL, Taki W, Simon RP. 2002. Activation of Bcl-2-associated death protein and counter-response of Akt within cell populations during seizure-induced neuronal death. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **22**: 8458-8465.

Herrant M, Jacquél A, Marchetti S, Belhacène N, Colosetti P, Luciano F, Auberger P. 2004. Cleavage of Mcl-1 by caspases impaired its ability to counteract Bim-induced apoptosis. *Oncogene* **23**: 7863-7873.

Herrmann JM, Hell K. 2005. Chopped, trapped or tacked--protein translocation into the IMS of mitochondria. *Trends in Biochemical Sciences* **30**: 205-211.

Hershko A, Ciechanover A. 1998. The ubiquitin system. *Annual Review of Biochemistry* **67**: 425-479.

- Hicke L, Dunn R. 2003.** Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **19**: 141-172.
- Hietakangas V, Anckar J, Blomster HA, Fujimoto M, Palvimo JJ, Nakai A, Sistonen L. 2006.** PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 45-50.
- Higo T, Hattori M, Nakamura T, Natsume T, Michikawa T, Mikoshiba K. 2005.** Subtype-specific and ER lumenal environment-dependent regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 by ERp44. *Cell* **120**: 85-98.
- Hilgarth RS, Murphy LA, Skaggs HS, Wilkerson DC, Xing H, Sarge KD. 2004.** Regulation and function of SUMO modification. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 53899-53902.
- Hill MM, Adrain C, Duriez PJ, Creagh EM, Martin SJ. 2004.** Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *The EMBO Journal* **23**: 2134-2145.
- Hoege C, Pfander B, Moldovan G, Pyrowolakis G, Jentsch S. 2002.** RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* **419**: 135-141.
- Hoetelmans R, van Slooten HJ, Keijzer R, Erkeland S, van de Velde CJ, Dierendonck JH. 2000.** Bcl-2 and Bax proteins are present in interphase nuclei of mammalian cells. *Cell Death and Differentiation* **7**: 384-392.
- Hogg PJ. 2003.** Disulfide bonds as switches for protein function. *Trends in Biochemical Sciences* **28**: 210-214.
- Hong SJ, Dawson TM, Dawson VL. 2004.** Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling. *Trends in Pharmacological Sciences* **25**: 259-264.
- Hübner A, Barrett T, Flavell RA, Davis RJ. 2008.** Multisite phosphorylation regulates Bim stability and apoptotic activity. *Molecular Cell* **30**: 415-425.
- Inagaki M, Gonda Y, Ando S, Kitamura S, Nishi Y, Sato C. 1989.** Regulation of assembly-disassembly of intermediate filaments in vitro. *Cell Structure and Function* **14**: 279-286.
- Inoshita S, Takeda K, Hatai T, Terada Y, Sano M, Hata J, Umezawa A, Ichijo H. 2002.** Phosphorylation and inactivation of myeloid cell leukemia 1 by JNK in response to oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry* **277**: 43730-43734.
- Ishikawa Y, Kusaka E, Enokido Y, Ikeuchi T, Hatanaka H. 2003.** Regulation of Bax translocation through phosphorylation at Ser-70 of Bcl-2 by MAP kinase in NO-induced neuronal apoptosis. *Molecular and Cellular Neurosciences* **24**: 451-459.
- Ito T, Deng X, Carr B, May WS. 1997.** Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function. *The Journal of Biological Chemistry* **272**: 11671-11673.
- Itoh T, Horio T. 2001.** DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is cleaved during UV-induced apoptosis. *Journal of Dermatological Science* **25**: 72-77.
- Jacobson MD, Weil M, Raff MC. 1997.** Programmed cell death in animal development. *Cell* **88**: 347-354.
- Jamil S, Sobouti R, Hojabrpour P, Raj M, Kast J, Duronio V. 2005.** A proteolytic fragment of Mcl-1 exhibits nuclear localization and regulates cell growth by interaction with Cdk1. *The Biochemical Journal* **387**: 659-667.

- Jariel-Encontre I, Bossis G, Piechaczyk M. 2008.** Ubiquitin-independent degradation of proteins by the proteasome. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1786**: 153-177.
- Jeong S, Gaume B, Lee Y, Hsu Y, Ryu S, Yoon S, Youle RJ. 2004.** Bcl-x(L) sequesters its C-terminal membrane anchor in soluble, cytosolic homodimers. *The EMBO Journal* **23**: 2146-2155.
- Jin Z, Gao F, Flagg T, Deng X. 2004.** Nicotine induces multi-site phosphorylation of Bad in association with suppression of apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 23837-23844.
- Johnson BW, Boise LH. 1999.** Bcl-2 and caspase inhibition cooperate to inhibit tumor necrosis factor- α -induced cell death in a Bcl-2 cleavage-independent fashion. *The Journal of Biological Chemistry* **274**: 18552-18558.
- Johnson DR, Cok SJ, Feldmann H, Gordon JI. 1994.** Suppressors of nmtl-181, a conditional lethal allele of the *Saccharomyces cerevisiae* myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase gene, reveal proteins involved in regulating protein N-myristoylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 10158-10162.
- Johnson ES, Gonda DK, Varshavsky A. 1990.** Cis-trans recognition and subunit-specific degradation of short-lived proteins. *Nature* **346**: 287-291.
- Joy A, Panicker S, Shapiro JR. 2000.** Altered nuclear localization of bax protein in BCNU-resistant glioma cells. *Journal of Neuro-Oncology* **49**: 117-129.
- Joza N, Pospisilik JA, Hangen E, Hanada T, Modjtahedi N, Penninger JM, Kroemer G. 2009.** AIF: not just an apoptosis-inducing factor. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1171**: 2-11.
- Kalderon D, Roberts BL, Richardson WD, Smith AE. 1984.** A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* **39**: 499-509.
- Kamer I, Sarig R, Zaltsman Y, Niv H, Oberkovitz G, Regev L, Haimovich G, Lerenthal Y, Marcellus RC, Gross A. 2005.** Proapoptotic BID is an ATM effector in the DNA-damage response. *Cell* **122**: 593-603.
- Kang MH, Reynolds CP. 2009.** Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* **15**: 1126-1132.
- Karbowski M, Lee Y, Gaume B, Jeong S, Frank S, Nechushtan A, Santel A, Fuller M, Smith CL, Youle RJ. 2002.** Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. *The Journal of Cell Biology* **159**: 931-938.
- Karbowski M, Norris KL, Cleland MM, Jeong S, Youle RJ. 2006.** Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis. *Nature* **443**: 658-662.
- Karin M, Ben-Neriah Y. 2000.** Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annual Review of Immunology* **18**: 621-663.
- Kataoka N, Bachorik JL, Dreyfuss G. 1999.** Transportin-SR, a nuclear import receptor for SR proteins. *The Journal of Cell Biology* **145**: 1145-1152.
- Kelliher MA, Grimm S, Ishida Y, Kuo F, Stanger BZ, Leder P. 1998.** The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF- κ B signal. *Immunity* **8**: 297-303.
- Kerbiriou M, Teng L, Benz N, Trouvé P, Férec C. 2009.** The calpain, caspase 12, caspase 3 cascade leading to apoptosis is altered in F508del-CFTR expressing cells. *PLoS One* **4**: e8436.

- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* **26**: 239-257.
- Kharbanda S, Saxena S, Yoshida K, Pandey P, Kaneki M, Wang Q, Cheng K, Chen YN, Campbell A, Sudha T, Yuan ZM, Narula J, Weichselbaum R, Nalin C, Kufe D. 2000.** Translocation of SAPK/JNK to mitochondria and interaction with Bcl-x(L) in response to DNA damage. *The Journal of Biological Chemistry* **275**: 322-327.
- Kim B, Ryu S, Song B. 2006.** JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. *The Journal of Biological Chemistry* **281**: 21256-21265.
- Kim TH, Zhao Y, Barber MJ, Kuharsky DK, Yin XM. 2000.** Bid-induced cytochrome c release is mediated by a pathway independent of mitochondrial permeability transition pore and Bax. *The Journal of Biological Chemistry* **275**: 39474-39481.
- Klareskog L, Rönnelid J, Lundberg K, Padyukov L, Alfredsson L. 2008.** Immunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Annual Review of Immunology* **26**: 651-675.
- Kleuss C, Krause E. 2003.** Galpha(s) is palmitoylated at the N-terminal glycine. *The EMBO Journal* **22**: 826-832.
- Klumpp S, Mäurer A, Zhu Y, Aichele D, Pinna LA, Krieglstein J. 2004.** Protein kinase CK2 phosphorylates BAD at threonine-117. *Neurochemistry International* **45**: 747-752.
- Komatsu K, Miyashita T, Hang H, Hopkins KM, Zheng W, Cuddeback S, Yamada M, Lieberman HB, Wang HG. 2000.** Human homologue of *S. pombe* Rad9 interacts with BCL-2/BCL-xL and promotes apoptosis. *Nature Cell Biology* **2**: 1-6.
- Konishi Y, Lehtinen M, Donovan N, Bonni A. 2002.** Cdc2 phosphorylation of BAD links the cell cycle to the cell death machinery. *Molecular Cell* **9**: 1005-1016.
- Kozopas KM, Yang T, Buchan HL, Zhou P, Craig RW. 1993.** MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 3516-3520.
- Krajewski S, Krajewska M, Ellerby LM, Welsh K, Xie Z, Deveraux QL, Salvesen GS, Bredesen DE, Rosenthal RE, Fiskum G, Reed JC. 1999.** Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 5752-5757.
- Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, Schibler MJ, Fenton W, Reed JC. 1993.** Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Research* **53**: 4701-4714.
- Krause K, Krupinska K. 2009.** Nuclear regulators with a second home in organelles. *Trends in Plant Science* **14**: 194-199.
- Kretsovali A, Spilianakis C, Dimakopoulos A, Makatounakis T, Papamatheakis J. 2001.** Self-association of class II transactivator correlates with its intracellular localization and transactivation. *The Journal of Biological Chemistry* **276**: 32191-32197.

- Kriazhev L. 2009.** Calcium channel as a potential anticancer agent. *Medical Hypotheses* **73**: 655-656.
- Kroemer G. 1998.** The mitochondrion as an integrator/coordinator of cell death pathways. *Cell Death and Differentiation* **5**: 547.
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G; Nomenclature Committee on Cell Death 2009. 2009.** Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation* **16**: 3-11.
- Kucharczak JF, Simmons MJ, Duckett CS, Gélinas C. 2005.** Constitutive proteasome-mediated turnover of Bfl-1/A1 and its processing in response to TNF receptor activation in FL5.12 pro-B cells convert it into a prodeath factor. *Cell Death and Differentiation* **12**: 1225-1239.
- Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, Bonzon C, Sullivan BA, Green DR, Newmeyer DD. 2005.** BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Molecular Cell* **17**: 525-535.
- Kyriakis JM, Avruch J. 1996.** Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* **18**: 567-577.
- Lai MC, Lin RI, Huang SY, Tsai CW, Tarn WY. 2000.** A human importin-beta family protein, transportin-SR2, interacts with the phosphorylated RS domain of SR proteins. *The Journal of Biological Chemistry* **275**: 7950-7957.
- Lai MC, Lin RI, Tarn WY. 2001.** Transportin-SR2 mediates nuclear import of phosphorylated SR proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 10154-10159.
- Lanave C, Santamaria M, Saccone C. 2004.** Comparative genomics: the evolutionary history of the Bcl-2 family. *Gene* **333**: 71-79.
- Lange A, Mills RE, Lange CJ, Stewart M, Devine SE, Corbett AH. 2007.** Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *The Journal of Biological Chemistry* **282**: 5101-5105.
- Launay S, Hermine O, Fontenay M, Kroemer G, Solary E, Garrido C. 2005.** Vital functions for lethal caspases. *Oncogene* **24**: 5137-5148.
- Lavrik I, Golks A, Krammer PH. 2005.** Death receptor signaling. *Journal of Cell Science* **118**: 265-267.
- Lawyer C, Pai S, Watabe M, Borgia P, Mashimo T, Eagleton L, Watabe K. 1996.** Antimicrobial activity of a 13 amino acid tryptophan-rich peptide derived from a putative porcine precursor protein of a novel family of antibacterial peptides. *FEBS Letters* **390**: 95-98.
- Leber B, Lin J, Andrews DW. 2007.** Embedded together: the life and death consequences of interaction of the Bcl-2 family with membranes. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death* **12**: 897-911.
- Lee DH, Goldberg AL. 1998.** Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends in Cell Biology* **8**: 397-403.
- Lee JC, Peter ME, 2003.** Regulation of apoptosis by ubiquitination. *Immunological Reviews* **193**: 39-47.

Lee MH, Lee SW, Lee EJ, Choi SJ, Chung SS, Lee JI, Cho JM, Seol JH, Baek SH, Kim KI, Chiba T, Tanaka K, Bang OS, Chung CH. 2006. SUMO-specific protease SUSP4 positively regulates p53 by promoting Mdm2 self-ubiquitination. *Nature Cell Biology* **8**: 1424-1431.

Lee N, MacDonald H, Reinhard C, Halenbeck R, Roulston A, Shi T, Williams LT. 1997. Activation of hPAK65 by caspase cleavage induces some of the morphological and biochemical changes of apoptosis. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 13642-13647.

Lehr S, Kotzka J, Avci H, Knebel B, Muller S, Hanisch FG, Jacob S, Haak C, Susanto F, Muller-Wieland D. 2005. Effect of sterol regulatory element binding protein-1a on the mitochondrial protein pattern in human liver cells detected by 2D-DIGE. *Biochemistry* **44**: 5117-5128.

Lemasters JJ, Qian T, He L, Kim J, Elmore SP, Cascio WE, Brenner DA. 2002. Role of mitochondrial inner membrane permeabilization in necrotic cell death, apoptosis, and autophagy. *Antioxidants & Redox Signaling* **4**: 769-781.

Le Romancer M, Cosulich SC, Jackson SP, Clarke PR. 1996. Cleavage and inactivation of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit during apoptosis in *Xenopus* egg extracts. *Journal of Cell Science* **109**: 3121-3127.

Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ. 2002. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* **2**: 183-192.

Levinger L, Varshavsky A. 1982. Selective arrangement of ubiquitinated and D1 protein-containing nucleosomes within the *Drosophila* genome. *Cell* **28**: 375-385.

Li B, Dou QP. 2000. Bax degradation by the ubiquitin/proteasome-dependent pathway: involvement in tumor survival and progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 3850-3855.

Li D, Ueta E, Kimura T, Yamamoto T, Osaki T. 2004a. Reactive oxygen species (ROS) control the expression of Bcl-2 family proteins by regulating their phosphorylation and ubiquitination. *Cancer Science* **95**: 644-650.

Li LY, Luo X, Wang X. 2001. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **412**: 95-99.

Li WQ, Jiang Q, Khaled AR, Keller JR, Durum SK. 2004b. Interleukin-7 inactivates the pro-apoptotic protein Bad promoting T cell survival. *The Journal of Biological Chemistry* **279**:29160-29166.

Liao P, Tan S, Lieu C, Jung H. 2008. Involvement of endoplasmic reticulum in paclitaxel-induced apoptosis. *Journal of Cellular Biochemistry* **104**: 1509-1523.

Lilliehook C, Chan S, Choi EK, Zaidi NF, Wasco W, Mattson MP, Buxbaum JD. 2002. Calsenilin enhances apoptosis by altering endoplasmic reticulum calcium signaling. *Molecular and Cellular Neurosciences* **19**: 552-559.

Lin B, Kolluri SK, Lin F, Liu W, Han YH, Cao X, Dawson MI, Reed JC, Zhang XK. 2004. Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3. *Cell* **116**: 527-540.

- Lindenboim L, Blacher E, Borner C, Stein R. 2010.** Regulation of stress-induced nuclear protein redistribution: a new function of Bax and Bak uncoupled from Bcl-x(L). *Cell Death and Differentiation* **17**: 346-359.
- Lindsten T, Ross AJ, King A, Zong WX, Rathmell JC, Shiels HA, Ulrich E, Waymire KG, Mahar P, Frauwirth K, Chen Y, Wei M, Eng VM, Adelman DM, Simon MC, Ma A, Golden JA, Evan G, Korsmeyer SJ, MacGregor GR, Thompson CB. 2000.** The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Molecular Cell* **6**: 1389-1399.
- Linseman DA, Butts BD, Precht TA, Phelps RA, Le SS, Laessig TA, Bouchard RJ, Florez-McClure ML, Heidenreich KA. 2004.** Glycogen synthase kinase-3 β phosphorylates Bax and promotes its mitochondrial localization during neuronal apoptosis. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **24**: 9993-10002.
- Lischka P, Sorg G, Kann M, Winkler M, Stamminger T. 2003.** A nonconventional nuclear localization signal within the UL84 protein of human cytomegalovirus mediates nuclear import via the importin α /beta pathway. *Journal of Virology* **77**: 3734-3748.
- Lizcano JM, Morrice N, Cohen P. 2000.** Regulation of BAD by cAMP-dependent protein kinase is mediated via phosphorylation of a novel site, Ser155. *The Biochemical Journal* **349**: 547-557.
- Loeffler M, Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Metivier D, Nieminen AL, Brothers G, Penninger JM, Kroemer G. 2001.** Dominant cell death induction by extramitochondrially targeted apoptosis-inducing factor. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **15**: 758-767.
- Lombardo E, Ramírez JC, Garcia J, Almendral JM. 2002.** Complementary roles of multiple nuclear targeting signals in the capsid proteins of the parvovirus minute virus of mice during assembly and onset of infection. *Journal of Virology* **76**: 7049-7059.
- Lomonosova E, Chinnadurai G. 2008.** BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene* **27** Suppl 1: S2-19.
- Lu J, Caplan MS, Li D, Jilling T. 2008.** Polyunsaturated fatty acids block platelet-activating factor-induced phosphatidylinositol 3 kinase/Akt-mediated apoptosis in intestinal epithelial cells. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* **294**: G1181-1190.
- Lu M, Tzang B, Kuo W, Wu F, Chen Y, Tsai C, Huang C, Lee S. 2007.** More activated cardiac mitochondrial-dependent apoptotic pathway in obese Zucker rats. *Obesity (Silver Spring, Md.)* **15**: 2634-2642.
- Lufei C, Cao X. 2009.** Nuclear import of Pin1 is mediated by a novel sequence in the PPIase domain. *FEBS Letters* **583**: 271-276.
- Lüthi AU, Martin SJ. 2007.** The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death and Differentiation* **14**: 641-650.
- McLaughlin S, Aderem A. 1995.** The myristoyl-electrostatic switch: a modulator of reversible protein-membrane interactions. *Trends in Biochemical Sciences* **20**: 272-276.
- Magee T, Seabra MC. 2005.** Fatty acylation and prenylation of proteins: what's hot in fat. *Current Opinion in Cell Biology* **17**: 190-196.
- Mahajan R, Gerace L, Melchior F. 1998.** Molecular characterization of the SUMO-1 modification of RanGAP1 and its role in nuclear envelope association. *The Journal of Cell Biology* **140**: 259-270.

- Makkerh JP, Dingwall C, Laskey RA. 1996.** Comparative mutagenesis of nuclear localization signals reveals the importance of neutral and acidic amino acids. *Current Biology: CB* **6**: 1025-1027.
- Martin MC, Allan LA, Mancini EJ, Clarke PR. 2008.** The docking interaction of caspase-9 with ERK2 provides a mechanism for the selective inhibitory phosphorylation of caspase-9 at threonine 125. *The Journal of Biological Chemistry* **283**: 3854-3865.
- Masamha CP, Benbrook DM. 2009.** Cyclin D1 degradation is sufficient to induce G1 cell cycle arrest despite constitutive expression of cyclin E2 in ovarian cancer cells. *Cancer Research* **69**: 6565-6572.
- Massaad CA, Portier BP, Taglialatela G. 2004.** Inhibition of transcription factor activity by nuclear compartment-associated Bcl-2. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 54470-54478.
- Masters SC, Yang H, Datta SR, Greenberg ME, Fu H. 2001.** 14-3-3 inhibits Bad-induced cell death through interaction with serine-136. *Molecular Pharmacology* **60**: 1325-1331.
- Mathai JP, Germain M, Shore GC. 2005.** BH3-only BIK regulates BAX,BAK-dependent release of Ca²⁺ from endoplasmic reticulum stores and mitochondrial apoptosis during stress-induced cell death. *The Journal of Biological Chemistry* **280**: 23829-23836.
- Matunis MJ, Coutavas E, Blobel G. 1996.** A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *The Journal of Cell Biology* **135**: 1457-1470.
- Matunis MJ, Wu J, Blobel G. 1998.** SUMO-1 modification and its role in targeting the Ran GTPase-activating protein, RanGAP1, to the nuclear pore complex. *The Journal of Cell Biology* **140**: 499-509.
- Maurer U, Charvet C, Wagman AS, Dejardin E, Green DR. 2006.** Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. *Molecular Cell* **21**: 749-760.
- May WS Jr. 1997.** Control of apoptosis by cytokines. *Advances in pharmacology* **41**: 219-246.
- Mayo LD, Donner DB. 2001.** A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 11598-11603.
- Melchior F, Schergaut M, Pichler A. 2003.** SUMO: ligases, isopeptidases and nuclear pores. *Trends in Biochemical Sciences* **28**: 612-618.
- Melino G. 2005.** Discovery of the ubiquitin proteasome system and its involvement in apoptosis. *Cell Death and Differentiation* **12**: 1155-1157.
- Ménoret E, Gomez-Bougie P, Surget S, Trichet V, Oliver L, Pellat-Deceunynck C, Amiot M. 2009.** Mcl-1(128-350) fragment induces apoptosis through direct interaction with Bax. *FEBS Letters* **584**: 487-492.
- Michael D, Oren M. 2003.** The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. *Seminars in Cancer Biology* **13**: 49-58.
- Micheau O, Tschopp J. 2003.** Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* **114**: 181-190.
- Michels J, Johnson PWM, Packham G. 2005.** Mcl-1. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **37**: 267-271.

- Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, Moll UM. 2003.** p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Molecular Cell* **11**: 577-590.
- Miramar MD, Costantini P, Ravagnan L, Saraiva LM, Haouzi D, Brothers G, Penninger JM, Peleato ML, Kroemer G, Susin SA. 2001.** NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *The Journal of Biological Chemistry* **276**: 16391-16398.
- Mishkind M. 2001.** Morbid myristoylation. *Trends in Cell Biology* **11**: 191.
- Mishra R, Barthwal MK, Sondarva G, Rana B, Wong L, Chatterjee M, Woodgett JR, Rana A. 2007.** Glycogen synthase kinase-3 β induces neuronal cell death via direct phosphorylation of mixed lineage kinase 3. *The Journal of Biological Chemistry* **282**: 30393-30405.
- Mitchell JW, Baik N, Castellino FJ, Miles LA. 2006.** Plasminogen inhibits TNF α -induced apoptosis in monocytes. *Blood* **107**: 4383-4390.
- Mizoguchi M, Manabe M, Kawamura Y, Kondo Y, Ishidoh K, Kominami E, Watanabe K, Asaga H, Senshu T, Ogawa H. 1998.** Deimination of 70-kD nuclear protein during epidermal apoptotic events in vitro. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* **46**: 1303-1309.
- Morgan DO. 1995.** Principles of CDK regulation. *Nature* **374**: 131-134.
- Morishima N, Nakanishi K, Tsuchiya K, Shibata T, Seiwa E. 2004.** Translocation of Bim to the endoplasmic reticulum (ER) mediates ER stress signaling for activation of caspase-12 during ER stress-induced apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 50375-50381.
- Morris EJ, Keramaris E, Rideout HJ, Slack RS, Dyson NJ, Stefanis L, Park DS. 2001.** Cyclin-dependent kinases and P53 pathways are activated independently and mediate Bax activation in neurons after DNA damage. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **21**: 5017-5026.
- Moulding DA, Quayle JA, Hart CA, Edwards SW. 1998.** Mcl-1 expression in human neutrophils: regulation by cytokines and correlation with cell survival. *Blood* **92**: 2495-2502.
- Mueller JC, Andreoli C, Prokisch H, Meitinger T. 2004.** Mechanisms for multiple intracellular localization of human mitochondrial proteins. *Mitochondrion* **3**: 315-325.
- Mukherjee S, Shields D. 2009.** Nuclear import is required for the pro-apoptotic function of the Golgi protein p115. *The Journal of Biological Chemistry* **284**: 1709-1717.
- Murphy KM, Ranganathan V, Farnsworth ML, Kavallaris M, Lock RB. 2000.** Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. *Cell Death and Differentiation* **7**: 102-111.
- Murray D, Ben-Tal N, Honig B, McLaughlin S. 1997.** Electrostatic interaction of myristoylated proteins with membranes: simple physics, complicated biology. *Structure (London, England: 1993)* **5**: 985-989.
- Musti AM, Treier M, Bohmann D. 1997.** Reduced ubiquitin-dependent degradation of c-Jun after phosphorylation by MAP kinases. *Science (New York, N.Y.)* **275**: 400-402.
- Nakashima K, Hagiwara T, Yamada M. 2002.** Nuclear localization of peptidylarginine deiminase V and histone deimination in granulocytes. *The Journal of Biological Chemistry* **277**: 49562-49568.
- Neupert W, Herrmann JM. 2007.** Translocation of proteins into mitochondria. *Annual Review of Biochemistry* **76**: 723-749.

- Nicholson DW, Neupert W. 1989.** Import of cytochrome c into mitochondria: reduction of heme, mediated by NADH and flavin nucleotides, is obligatory for its covalent linkage to apocytochrome c. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**: 4340-4344.
- Nicholson DW, Thornberry NA. 1997.** Caspases: killer proteases. *Trends in Biochemical Sciences* **22**: 299-306.
- Nijhawan D, Fang M, Traer E, Zhong Q, Gao W, Du F, Wang X. 2003.** Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes & Development* **17**: 1475-1486.
- Nikrad M, Johnson T, Puthalalath H, Coultas L, Adams J, Kraft AS. 2005.** The proteasome inhibitor bortezomib sensitizes cells to killing by death receptor ligand TRAIL via BH3-only proteins Bik and Bim. *Molecular Cancer Therapeutics* **4**: 443-449.
- Núñez G, London L, Hockenbery D, Alexander M, McKearn JP, Korsmeyer SJ. 1990.** Deregulated Bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hemopoietic cell lines. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **144**: 3602-3610.
- Ochman H, Gerber AS, Hartl DL. 1988.** Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* **120**: 621-623.
- Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N. 2000.** Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science (New York, N.Y.)* **288**: 1053-1058.
- Oda Y, Leffler H, Sakakura Y, Kasai K, Barondes SH. 1991.** Human breast carcinoma cDNA encoding a galactoside-binding lectin homologous to mouse Mac-2 antigen. *Gene* **99**: 279-283.
- Okada H, Mak TW. 2004.** Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nature Reviews Cancer* **4**:592-603.
- Okazaki K, Sagata N. 1995.** The Mos/MAP kinase pathway stabilizes c-Fos by phosphorylation and augments its transforming activity in NIH 3T3 cells. *The EMBO Journal* **14**: 5048-5059.
- Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. 1993.** Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**: 609-619.
- Opferman JT, Korsmeyer SJ. 2003.** Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nature Immunology* **4**: 410-415.
- Osley MA. 2004.** H2B ubiquitylation: the end is in sight. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1677**: 74-78.
- Ostergaard H, Tachibana C, Winther JR. 2004.** Monitoring disulfide bond formation in the eukaryotic cytosol. *The Journal of Cell Biology* **166**: 337-345.
- Otera H, Ohsakaya S, Nagaura Z, Ishihara N, Mihara K. 2005.** Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space. *The EMBO Journal* **24**: 1375-1386.
- Ottillie S, Diaz JL, Horne W, Chang J, Wang Y, Wilson G, Chang S, Weeks S, Fritz LC, Oltersdorf T. 1997.** Dimerization properties of human BAD. Identification of a BH-3 domain and analysis of its binding to mutant BCL-2 and BCL-XL proteins. *The Journal of Biological Chemistry* **272**: 30866-30872.

Owens TW, Valentijn AJ, Upton J, Keeble J, Zhang L, Lindsay J, Zouq NK, Gilmore AP. 2009. Apoptosis commitment and activation of mitochondrial Bax during anoikis is regulated by p38MAPK. *Cell Death and Differentiation* **16**: 1551-1562.

Ozaki T, Yamashita T, Ishiguro S. 2009. Mitochondrial m-calpain plays a role in the release of truncated apoptosis-inducing factor from the mitochondria. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1793**: 1848-1859.

Pap M, Cooper GM. 1998. Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway. *The Journal of Biological Chemistry* **273**: 19929-19932.

Papa FR, Hochstrasser M. 1993. The yeast DOA4 gene encodes a deubiquitinating enzyme related to a product of the human tre-2 oncogene. *Nature* **366**: 313-319.

Park JK, Kang MY, Kim YH, Jo HC, Shin JK, Choi WJ, Lee SA, Lee JH, Choi WS, Paik WY. 2008. PKC delta in preeclamptic placentas promotes Bax dissociation from 14-3-3 zeta through 14-3-3 zeta phosphorylation. *Placenta* **29**: 584-592.

Pellegrini L, Scorrano L. 2007. A cut short to death: Parl and Opa1 in the regulation of mitochondrial morphology and apoptosis. *Cell Death and Differentiation* **14**: 1275-1284.

Peter ME, Krammer PH. 2003. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death and Differentiation* **10**: 26-35.

Pfanner N, Craig EA, Hönlinger A. 1997. Mitochondrial preprotein translocase. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **13**: 25-51.

Philips MR, Pillinger MH, Staud R, Volker C, Rosenfeld MG, Weissmann G, and Stock JB. 1993. Carboxyl methylation of Ras-related proteins during signal transduction in neutrophils. *Science* **259**: 977-980.

Pichler A, Gast A, Seeler JS, Dejean A, Melchior F. 2002. The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell* **108**: 109-120.

Pichler A, Knipscheer P, Oberhofer E, van Dijk WJ, Körner R, Olsen JV, Jentsch S, Melchior F, Sixma TK. 2005. SUMO modification of the ubiquitin-conjugating enzyme E2-25K. *Nature Structural & Molecular Biology* **12**: 264-269.

Pickart CM. 2001. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annual Review of Biochemistry* **70**: 503-533.

Polster BM, Basañez G, Etxebarria A, Hardwick JM, Nicholls DG. 2005. Calpain I induces cleavage and release of apoptosis-inducing factor from isolated mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry* **280**: 6447-6454.

Polzien L, Baljuls A, Rennefahrt UEE, Fischer A, Schmitz W, Zahedi RP, Sickmann A, Metz R, Albert S, Benz R, Hekman M, Rapp UR. 2009. Identification of novel in vivo phosphorylation sites of the human proapoptotic protein BAD: pore-forming activity of BAD is regulated by phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry* **284**: 28004-28020.

Poommipanit PB, Chen B, Oltvai ZN. 1999. Interleukin-3 induces the phosphorylation of a distinct fraction of bcl-2. *The Journal of Biological Chemistry* **274**: 1033-1039.

Portier BP, Taglialatela G. 2006. Bcl-2 localized at the nuclear compartment induces apoptosis after transient overexpression. *The Journal of Biological Chemistry* **281**: 40493-40502.

Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, Lee L, Kelly PN, Huntington ND, Hughes PD, Michalak EM, McKimm-Breschkin J, Motoyama N, Gotoh T, Akira S, Bouillet P, Strasser A. 2007. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* **129**: 1337-1349.

Raffo AJ, Kim AL, Fine RL. 2000. Formation of nuclear Bax/p53 complexes is associated with chemotherapy induced apoptosis. *Oncogene* **19**: 6216-6228.

Rai KR, Moore J, Wu J, Novick SC, O'Brien SM. 2008. Effect of the addition of oblimersen (Bcl-2 antisense) to fludarabine/cyclophosphamide for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL) on survival in patients who achieve CR/nPR: Five-year follow-up from a randomized phase III study. ASCO Meeting Abstracts. *Journal of Clinical Oncology* **26**.

Raimond J, Rouleux F, Monsigny M, Legrand A. 1995. The second intron of the human galectin-3 gene has a strong promoter activity down-regulated by p53. *FEBS Letters* **363**: 165-169.

Ramuz O, Isnardon D, Devillard E, Charafe-Jauffret E, Hassoun J, Birg F, Xerri L. 2003. Constitutive nuclear localization and initial cytoplasmic apoptotic activation of endogenous caspase-3 evidenced by confocal microscopy. *International Journal of Experimental Pathology* **84**: 75-81.

Raz A, Carmi P, Raz T, Hogan V, Mohamed A, Wolman SR. 1991. Molecular cloning and chromosomal mapping of a human galactoside-binding protein. *Cancer Research* **51**: 2173-2178.

Réb  C, Cathelin S, Launay S, Filomenko R, Pr votat L, L'Ollivier C, Gyan E, Micheau O, Grant S, Dubart-Kupperschmitt A, Fontenay M, Solary E. 2007. Caspase-8 prevents sustained activation of NF-kappaB in monocytes undergoing macrophagic differentiation. *Blood* **109**: 1442-1450.

Rechsteiner M, Rogers SW. 1996. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends in Biochemical Sciences* **21**: 267-271.

Reed JC. 1998. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* **17**: 3225-3236.

Reef S, Zalckvar E, Shifman O, Bialik S, Sabanay H, Oren M, Kimchi A. 2006a. A short mitochondrial form of p19ARF induces autophagy and caspase-independent cell death. *Molecular Cell* **22**: 463-475.

Reef S, Kimchi A. 2006b. A smARF way to die: a novel short isoform of p19ARF is linked to autophagic cell death. *Autophagy* **2**: 328-30.

Reinders J, Sickmann A. 2007. Modificomics: posttranslational modifications beyond protein phosphorylation and glycosylation. *Biomolecular Engineering* **24**: 169-177.

Ren Y, Stuart L, Lindberg FP, Rosenkranz AR, Chen Y, Mayadas TN, Savill J. 2001. Nonphlogistic clearance of late apoptotic neutrophils by macrophages: efficient phagocytosis independent of beta 2 integrins. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **166**: 4743-4750.

Resh MD. 1996. Regulation of cellular signalling by fatty acid acylation and prenylation of signal transduction proteins. *Cellular Signalling* **8**: 403-412.

Riemer J, Bulleid N, Herrmann JM. 2009. Disulfide formation in the ER and mitochondria: two solutions to a common process. *Science (New York, N.Y.)* **324**: 1284-1287.

Rimessi A, Giorgi C, Pinton P, Rizzuto R. 2008. The versatility of mitochondrial calcium signals: from stimulation of cell metabolism to induction of cell death. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1777**: 808-816.

- Riolobos L, Valle N, Hernando E, Maroto B, Kann M, Almendral JM. 2010.** Viral oncolysis that targets Raf-1 signaling control of nuclear transport. *Journal of Virology* **84**: 2090-2099.
- Rizzuto R, Brini M, Murgia M, Pozzan T. 1993.** Microdomains with high Ca^{2+} close to IP_3 -sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science (New York, N.Y.)* **262**: 744-747.
- Robbins J, Dilworth SM, Laskey RA, Dingwall C. 1991.** Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* **64**: 615-623.
- Robinet P, Mollet L, Gonzalez P, Normand T, Charpentier S, Brulé F, Dubois M, Legrand A. 2010.** The mitogaligin protein is addressed to the nucleus via a non-classical localization signal. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **392**: 53-57.
- Robinson NE, Robinson AB. 2001.** Deamidation of human proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 12409-12413.
- Rostovtseva TK, Boukari H, Antignani A, Shiu B, Banerjee S, Neutzner A, Youle RJ. 2009.** Bax activates endophilin B1 oligomerization and lipid membrane vesiculation. *The Journal of Biological Chemistry* **284**: 34390-34399.
- Rudel T, Bokoch GM. 1997.** Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science (New York, N.Y.)* **276**: 1571-1574.
- Rudner J, Lepple-Wienhues A, Budach W, Berschauer J, Friedrich B, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K, Belka C. 2001.** Wild-type, mitochondrial and ER-restricted Bcl-2 inhibit DNA damage-induced apoptosis but do not affect death receptor-induced apoptosis. *Journal of Cell Science* **114**: 4161-4172.
- Russell JH. 1983.** Internal disintegration model of cytotoxic lymphocyte-induced target damage. *Immunological Reviews* **72**: 97-118.
- Ruvolo PP, Deng X, Carr BK, May WS. 1998.** A functional role for mitochondrial protein kinase Calpha in Bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* **273**: 25436-25442.
- Ruvolo PP, Deng X, May WS. 2001.** Phosphorylation of Bcl2 and regulation of apoptosis. *Leukemia* **15**: 515-522.
- Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P. 2004.** Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* **23**: 2861-2874.
- Saintigny Y, Dumay A, Lambert S, Lopez BS. 2001.** A novel role for the Bcl-2 protein family: specific suppression of the RAD51 recombination pathway. *The EMBO Journal* **20**: 2596-2607.
- Sakahira H, Enari M, Nagata S. 1998.** Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* **391**: 96-99.
- Sakurai N, Utsumi T. 2006.** Posttranslational N-myristoylation is required for the anti-apoptotic activity of human tGelsolin, the C-terminal caspase cleavage product of human gelsolin. *The Journal of Biological Chemistry* **281**: 14288-14295.
- Sansome C, Zaika A, Marchenko ND, Moll UM. 2001.** Hypoxia death stimulus induces translocation of p53 protein to mitochondria. Detection by immunofluorescence on whole cells. *FEBS Letter* **488**: 110-115. Erratum in: *FEBS Letter* 2001, **501**: 97-98.

Sattler M, Liang H, Nettesheim D, Meadows RP, Harlan JE, Eberstadt M, Yoon HS, Shuker SB, Chang BS, Minn AJ, Thompson CB, Fesik SW. 1997. Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science (New York, N.Y.)* **275**: 983-986. **Saunders JW. 1966.** Death in embryonic systems. *Science (New York, N.Y.)* **154**: 604-612.

Schendel SL, Azimov R, Pawlowski K, Godzik A, Kagan BL, Reed JC. 1999. Ion channel activity of the BH3 only Bcl-2 family member, BID. *The Journal of Biological Chemistry* **274**: 21932-21936.

Schibli DJ, Hwang PM, Vogel HJ. 1999. Structure of the antimicrobial peptide tritrypticin bound to micelles: a distinct membrane-bound peptide fold. *Biochemistry* **38**: 16749-16755.

Schmitt E, Beauchemin M, Bertrand R. 2007. Nuclear colocalization and interaction between bcl-xL and cdk1(cdc2) during G2/M cell-cycle checkpoint. *Oncogene* **26**: 5851-5865.

Schreiber V, Molinete M, Boeuf H, de Murcia G, Ménissier-de Murcia J. 1992. The human poly(ADP-ribose) polymerase nuclear localization signal is a bipartite element functionally separate from DNA binding and catalytic activity. *The EMBO Journal* **11**: 3263-3269.

Schubert KM, Duronio V. 2001. Distinct roles for extracellular-signal-regulated protein kinase (ERK) mitogen-activated protein kinases and phosphatidylinositol 3-kinase in the regulation of Mcl-1 synthesis. *The Biochemical Journal* **356**: 473-480.

Schulze-Osthoff K, Walczak H, Dröge W, Krammer PH. 1994. Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis. *The Journal of Cell Biology* **127**: 15-20.

Schürmann A, Mooney AF, Sanders LC, Sells MA, Wang HG, Reed JC, Bokoch GM. 2000. p21-activated kinase 1 phosphorylates the death agonist bad and protects cells from apoptosis. *Molecular and Cellular Biology* **20**: 453-461.

Scovassi AI, Soldani C, Veneroni P, Bottone MG, Pellicciari C. 2009. Changes of mitochondria and relocation of the apoptosis-inducing factor during apoptosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1171**: 12-17.

Searle J, Kerr JF, Bishop CJ. 1982. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathology Annual* **17 Pt 2**: 229-259.

Sebti SM. 2005. Protein farnesylation: implications for normal physiology, malignant transformation, and cancer therapy. *Cancer Cell* **7**: 297-300.

Seeler J, Dejean A. 2003. Nuclear and unclear functions of SUMO. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **4**: 690-699.

Séité P, Ruchaud S, Hillion J, Gendron MC, Bruland O, Ségal-Bendirdjian E, Doskeland SO, Lillehaug JR, Lanotte M. 2000. Ectopic expression of Bcl-2 switches over nuclear signalling for cAMP-induced apoptosis to granulocytic differentiation. *Cell Death and Differentiation* **7**: 1081-1089.

Selsted ME, Novotny MJ, Morris WL, Tang YQ, Smith W, Cullor JS. 1992. Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. *The Journal of Biological Chemistry* **267**: 4292-4295.

Shabek N, Herman-Bachinsky Y, Ciechanover A. 2009. Ubiquitin degradation with its substrate, or as a monomer in a ubiquitination-independent mode, provides clues to proteasome regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 11907-11912.

Sheridan C, Delivani P, Cullen SP, Martin SJ. 2008. Bax- or Bak-induced mitochondrial fission can be uncoupled from cytochrome C release. *Molecular Cell* **31**: 570-585.

- Shroff EH, Snyder CM, Budinger GR, Jain M, Chew TL, Khuon S, Perlman H, Chandel NS. 2009.** BH3 peptides induce mitochondrial fission and cell death independent of BAX/BAK. *PLoS One* **4**:e5646.
- Sigal CT, Zhou W, Buser CA, McLaughlin S, Resh MD. 1994.** Amino-terminal basic residues of Src mediate membrane binding through electrostatic interaction with acidic phospholipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 12253-12257.
- Simizu S, Suzuki T, Muroi M, Lai NS, Takagi S, Dohmae N, Osada H. 2007.** Involvement of disulfide bond formation in the activation of heparanase. *Cancer Research* **67**: 7841-7849.
- Simonin K, Brotin E, Dufort S, Dutoit S, Goux D, N'diaye M, Denoyelle C, Gauduchon P, Poulain L. 2009.** Mcl-1 is an important determinant of the apoptotic response to the BH3-mimetic molecule HA14-1 in cisplatin-resistant ovarian carcinoma cells. *Molecular Cancer Therapeutics* **8**: 3162-3170.
- Sinchaikul S, Hongsachart P, Sriyam S, Tantipaiboonwong P, Phutrakul S, Chen S. 2008.** Current proteomic analysis and post-translational modifications of biomarkers in human lung cancer materials. *Chang Gung Medical Journal* **31**: 417-430.
- Singh N, Anand S. 1995.** Apoptosis in health and disease. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology* **39**: 91-94.
- Siomi H, Dreyfuss G. 1995.** A nuclear localization domain in the hnRNP A1 protein. *The Journal of Cell Biology* **129**: 551-560.
- Smithies O. 1965.** Disulfide-bond cleavage and formation in proteins. *Science (New York, N.Y.)* **150**: 1595-1598.
- Snowden RT, Sun X, Dyer MJS, Cohen GM. 2003.** Bisindolylmaleimide IX is a potent inducer of apoptosis in chronic lymphocytic leukaemic cells and activates cleavage of Mcl-1. *Leukemia: Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* **17**: 1981-1989.
- Sobko A, Ma H, Firtel RA. 2002.** Regulated SUMOylation and ubiquitination of DdMEK1 is required for proper chemotaxis. *Developmental Cell* **2**: 745-756.
- Sordet O, Rébé C, Plenchette S, Zermati Y, Hermine O, Vainchenker W, Garrido C, Solary E, Dubrez-Daloz L. 2002.** Specific involvement of caspases in the differentiation of monocytes into macrophages. *Blood* **100**: 4446-4453.
- Spence J, Gali RR, Dittmar G, Sherman F, Karin M, Finley D. 2000.** Cell cycle-regulated modification of the ribosome by a variant multiubiquitin chain. *Cell* **102**: 67-76.
- Stanger BZ, Leder P, Lee TH, Kim E, Seed B. 1995.** RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell* **81**: 513-523.
- Stein RL, Chen Z, Melandri F. 1995.** Kinetic studies of isopeptidase T: modulation of peptidase activity by ubiquitin. *Biochemistry* **34**: 12616-12623.
- Steinhusen U, Weiske J, Badock V, Tauber R, Bommert K, Huber O. 2001.** Cleavage and shedding of E-cadherin after induction of apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* **276**: 4972-4980.
- Stephenson RC, Clarke S. 1989.** Succinimide formation from aspartyl and asparaginyl peptides as a model for the spontaneous degradation of proteins. *The Journal of Biological Chemistry* **264**: 6164-6170.

Stitham J, Gleim SR, Douville K, Arehart E, Hwa J. 2006. Versatility and differential roles of cysteine residues in human prostacyclin receptor structure and function. *The Journal of Biological Chemistry* **281**: 37227-37236.

Strasser A. 2005. The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nature Reviews. Immunology* **5**: 189-200.

Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, Costantini P, Ferri KF, Irinopoulou T, Prévost MC, Brothers G, Mak TW, Penninger J, Earnshaw WC, Kroemer G. 2000. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *The Journal of Experimental Medicine* **192**: 571-580.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**: 441-446.

Tait SWG, de Vries E, Maas C, Keller AM, D'Santos CS, Borst J. 2007. Apoptosis induction by Bid requires unconventional ubiquitination and degradation of its N-terminal fragment. *The Journal of Cell Biology* **179**: 1453-1466.

Takehara T, Takahashi H. 2003. Suppression of Bcl-xL deamidation in human hepatocellular carcinomas. *Cancer Research* **63**: 3054-3057.

Tan Y, Ruan H, Demeter MR, Comb MJ. 1999. p90(RSK) blocks bad-mediated cell death via a protein kinase C-dependent pathway. *The Journal of Biological Chemistry* **274**: 34859-34867.

Tan Y, Demeter MR, Ruan H, Comb MJ. 2000. BAD Ser-155 phosphorylation regulates BAD/Bcl-XL interaction and cell survival. *The Journal of Biological Chemistry* **275**: 25865-25869.

Tanikawa C, Ueda K, Nakagawa H, Yoshida N, Nakamura Y, Matsuda K. 2009. Regulation of protein Citrullination through p53/PADI4 network in DNA damage response. *Cancer Research* **69**: 8761-8769.

Taylor RC, Adrain C, Martin SJ. 2005. Proteases, proteasomes and apoptosis: breaking Ub is hard to do. *Cell Death and Differentiation* **12**: 1213-1217.

Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **9**: 231-241.

Thomas M, Banks L. 1998. Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene* **17**: 2943-2954.

Thompson SJ, Loftus LT, Ashley MD, Meller R. 2008. Ubiquitin-proteasome system as a modulator of cell fate. *Current Opinion in Pharmacology* **8**: 90-95.

Truscott KN, Pfanner N, Voos W. 2001. Transport of proteins into mitochondria. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* **143**: 81-136.

Tse C, Shoemaker AR, Adickes J, Anderson MG, Chen J, Jin S, Johnson EF, Marsh KC, Mitten MJ, Nimmer P, Roberts L, Tahir SK, Xiao Y, Yang X, Zhang H, Fesik S, Rosenberg SH, Elmore SW. 2008. ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Research* **68**: 3421-3428.

Tsujimoto Y. 1989. Stress-resistance conferred by high level of bcl-2 alpha protein in human B lymphoblastoid cell. *Oncogene* **4**: 1331-1336.

Tsujimoto Y, Gorham J, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. 1985. The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science (New York, N.Y.)* **229**: 1390-1393.

Tsuruta F, Sunayama J, Mori Y, Hattori S, Shimizu S, Tsujimoto Y, Yoshioka K, Masuyama N, Gotoh Y. 2004. JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *The EMBO Journal* **23**: 1889-1899.

Turner C, Devitt A, Parker K, MacFarlane M, Giuliano M, Cohen GM, Gregory CD. 2003. Macrophage-mediated clearance of cells undergoing caspase-3-independent death. *Cell Death and Differentiation* **10**: 302-312.

Ueda Y, Koya T, Yoneda-Kato N, Kato JY. 2008. Small mitochondrial ARF (smARF) is located in both the nucleus and cytoplasm, induces cell death, and activates p53 in mouse fibroblasts. *FEBS Letter* **582**: 1459-64.

Ulrich HD. 2004. How to activate a damage-tolerant polymerase: consequences of PCNA modifications by ubiquitin and SUMO. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* **3**: 15-18.

Umahara T, Uchihara T. 2010. 14-3-3 Proteins and Spinocerebellar Ataxia Type 1: from Molecular Interaction to Human Neuropathology. *Cerebellum (London, England)*.

Ura S, Masuyama N, Graves JD, Gotoh Y. 2001. MST1-JNK promotes apoptosis via caspase-dependent and independent pathways. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* **6**: 519-530.

Utsumi T, Sakurai N, Nakano K, Ishisaka R. 2003. C-terminal 15 kDa fragment of cytoskeletal actin is posttranslationally N-myristoylated upon caspase-mediated cleavage and targeted to mitochondria. *FEBS Letters* **539**: 37-44.

Utz PJ, Anderson P. 2000. Life and death decisions: regulation of apoptosis by proteolysis of signaling molecules. *Cell Death and Differentiation* **7**: 589-602.

Valin A, Gill G. 2007. Regulation of the dual-function transcription factor Sp3 by SUMO. *Biochemical Society Transactions* **35**: 1393-1396.

Varshavsky A. 2003. The N-end rule and regulation of apoptosis. *Nature Cell Biology* **5**: 373-376.

Vaux DL, Cory S, Adams JM. 1988. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* **335**: 440-442.

Vaux DL, Silke J. 2005. IAPs--the ubiquitin connection. *Cell Death and Differentiation* **12**: 1205-1207.

Verhagen AM, Silke J, Ekert PG, Pakusch M, Kaufmann H, Connolly LM, Day CL, Tikoo A, Burke R, Wrobel C, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL. 2002. HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *The Journal of Biological Chemistry* **277**: 445-454.

Vilas GL, Corvi MM, Plummer GJ, Seime AM, Lambkin GR, Berthiaume LG. 2006. Posttranslational myristoylation of caspase-activated p21-activated protein kinase 2 (PAK2) potentiates late apoptotic events. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 6542-6547.

Virdee K, Parone PA, Tolkovsky AM. 2000. Phosphorylation of the pro-apoptotic protein BAD on serine 155, a novel site, contributes to cell survival. *Current Biology: CB* **10**: 1151-1154.

Vossenaar ER, Zendman AJW, van Venrooij WJ, Pruijn GJM. 2003. PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* **25**: 1106-1118.

- Wakankar AA, Borchardt RT. 2006.** Formulation considerations for proteins susceptible to asparagine deamidation and aspartate isomerization. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **95**: 2321-2336.
- Walensky LD, Pitter K, Morash J, Oh KJ, Barbuto S, Fisher J, Smith E, Verdine GL, Korsmeyer SJ. 2006.** A stapled BID BH3 helix directly binds and activates BAX. *Molecular Cell* **24**: 199-210.
- Walker NI, Harmon BV, Gobé GC, Kerr JF. 1988.** Patterns of cell death. *Methods and Achievements in Experimental Pathology* **13**: 18-54.
- Wang C, Yang P, Li M, Gong F. 2009b.** Characterization of a negative feedback network between SUMO4 expression and NFkappaB transcriptional activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **381**: 477-481.
- Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, and Baldwin AS. 1998.** NF-kappa B Antiapoptosis: Induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to Suppress Caspase-8 Activation. *Science* **281**: 1680-1683.
- Wang D, Sebti SM. 2005.** Palmitoylated cysteine 192 is required for RhoB tumor-suppressive and apoptotic activities. *The Journal of Biological Chemistry* **280**: 19243-19249.
- Wang HG, Pathan N, Ethell IM, Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, McKeon F, Bobo T, Franke TF, Reed JC. 1999.** Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science (New York, N.Y.)* **284**: 339-343.
- Wang P, Palese P, O'Neill RE. 1997.** The NPI-1/NPI-3 (karyopherin alpha) binding site on the influenza A virus nucleoprotein NP is a nonconventional nuclear localization signal. *Journal of Virology* **71**: 1850-1856.
- Wang Y, Wysocka J, Sayegh J, Lee Y, Perlin JR, Leonelli L, Sonbuchner LS, McDonald CH, Cook RG, Dou Y, Roeder RG, Clarke S, Stallcup MR, Allis CD, Coonrod SA. 2004.** Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylation. *Science (New York, N.Y.)* **306**: 279-283.
- Wang Y, Dawson VL, Dawson TM. 2009a.** Poly(ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: a key event in parthanatos. *Experimental Neurology* **218**: 193-202.
- Weedon D, Searle J, Kerr JF. 1979.** Apoptosis. Its nature and implications for dermatopathology. *The American Journal of Dermatopathology* **1**: 133-144.
- van Weeren PC, de Bruyn KM, de Vries-Smits AM, van Lint J, Burgering BM. 1998.** Essential role for protein kinase B (PKB) in insulin-induced glycogen synthase kinase 3 inactivation. Characterization of dominant-negative mutant of PKB. *The Journal of Biological Chemistry* **273**: 13150-13156.
- Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M, Thompson CB, Korsmeyer SJ. 2000.** tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes & Development* **14**: 2060-2071.
- White-Gilbertson S, Rubinchik S, Voelkel-Johnson C. 2008.** Transformation, translation and TRAIL: an unexpected intersection. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **19**: 167-172.
- Widmann C, Gerwins P, Johnson NL, Jarpe MB, Johnson GL. 1998.** MEK kinase 1, a substrate for DEVD-directed caspases, is involved in genotoxin-induced apoptosis. *Molecular and Cellular Biology* **18**: 2416-2429.
- Williams JR, Little JB, Shipley WU. 1974.** Association of mammalian cell death with a specific endonucleolytic degradation of DNA. *Nature* **252**: 754-755.

- Willis SN, Chen L, Dewson G, Wei A, Naik E, Fletcher JI, Adams JM, Huang DCS. 2005.** Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes & Development* **19**: 1294-1305.
- Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, van Delft MF, Chen L, Czabotar PE, Ierino H, Lee EF, Fairlie WD, Bouillet P, Strasser A, Kluck RM, Adams JM, Huang DCS. 2007.** Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science (New York, N.Y.)* **315**: 856-859.
- Wolff T, Unterstab G, Heins G, Richt JA, Kann M. 2002.** Characterization of an unusual importin alpha binding motif in the borna disease virus p10 protein that directs nuclear import. *The Journal of Biological Chemistry* **277**: 12151-12157.
- Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ. 1997.** Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *The Journal of Cell Biology* **139**: 1281-1292.
- Wu YC, Stanfield GM, Horvitz HR. 2000.** NUC-1, a caenorhabditis elegans DNase II homolog, functions in an intermediate step of DNA degradation during apoptosis. *Genes and Development* **14**: 536-548.
- Wyllie AH. 1987.** Apoptosis: cell death in tissue regulation. *The Journal of Pathology* **153**: 313-316.
- Xin M, Deng X. 2006.** Protein phosphatase 2A enhances the proapoptotic function of Bax through dephosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry* **281**: 18859-18867.
- Xin M, Gao F, May WS, Flagg T, Deng X. 2007.** Protein kinase Czeta abrogates the proapoptotic function of Bax through phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry* **282**: 21268-21277.
- Yaglom J, Linskens MH, Sadis S, Rubin DM, Futcher B, Finley D. 1995.** p34Cdc28-mediated control of Cln3 cyclin degradation. *Molecular and Cellular Biology* **15**: 731-741.
- Yan B, Zemskova M, Holder S, Chin V, Kraft A, Koskinen PJ, Lilly M. 2003.** The PIM-2 kinase phosphorylates BAD on serine 112 and reverses BAD-induced cell death. *The Journal of Biological Chemistry* **278**: 45358-45367.
- Yanagisawa H, Miyashita T, Nakano Y, Yamamoto D. 2003.** HSpin1, a transmembrane protein interacting with Bcl-2/Bcl-xL, induces a caspase-independent autophagic cell death. *Cell Death and Differentiation* **10**: 798-807.
- Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X. 1997.** Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* **275**: 1129-1132.
- Yang S, Galanis A, Witty J, Sharrocks AD. 2006.** An extended consensus motif enhances the specificity of substrate modification by SUMO. *The EMBO Journal* **25**: 5083-5093.
- Yang T, Kozopas KM, Craig RW. 1995.** The intracellular distribution and pattern of expression of Mcl-1 overlap with, but are not identical to, those of Bcl-2. *The Journal of Cell Biology* **128**: 1173-1184.
- Yao R, Cooper GM. 1995.** Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science (New York, N.Y.)* **267**: 2003-2006.
- Ye H, Cande C, Stephanou NC, Jiang S, Gurbuxani S, Larochette N, Daugas E, Garrido C, Kroemer G, Wu H. 2002.** DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nature Structural Biology* **9**: 680-684.

- Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. 1994.** BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* **369**: 321-323.
- You H, Pellegrini M, Tsuchihara K, Yamamoto K, Hacker G, Erlacher M, Villunger A, Mak TW. 2006.** FOXO3a-dependent regulation of Puma in response to cytokine/growth factor withdrawal. *The Journal of Experimental Medicine* **203**: 1657-1663.
- Youle RJ. 2007.** Cell biology. Cellular demolition and the rules of engagement. *Science (New York, N.Y.)* **315**: 776-777.
- Youle RJ, Strasser A. 2008.** The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **9**: 47-59.
- Yu C, Minemoto Y, Zhang J, Liu J, Tang F, Bui TN, Xiang J, Lin A. 2004.** JNK suppresses apoptosis via phosphorylation of the proapoptotic Bcl-2 family protein BAD. *Molecular Cell* **13**: 329-340.
- Yuan J, Yankner BA. 2000.** Apoptosis in the nervous system. *Nature* **407**: 802-809.
- Zebrowski DC, Alcendor RR, Kirshenbaum LA, Sadoshima J. 2006.** Caspase-3 mediated cleavage of MEKK1 promotes p53 transcriptional activity. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **40**: 605-618.
- Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ. 1996.** Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* **87**: 619-628.
- Zha J, Weiler S, Oh KJ, Wei MC, Korsmeyer SJ. 2000.** Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis. *Science (New York, N.Y.)* **290**: 1761-1765.
- Zhang B, Hirahashi J, Cullere X, Mayadas TN. 2003.** Elucidation of molecular events leading to neutrophil apoptosis following phagocytosis: cross-talk between caspase 8, reactive oxygen species, and MAPK/ERK activation. *The Journal of Biological Chemistry* **278**: 28443-28454.
- Zhang H, Saitoh H, Matunis MJ. 2002.** Enzymes of the SUMO modification pathway localize to filaments of the nuclear pore complex. *Molecular and Cellular Biology* **22**: 6498-6508.
- Zhao R, Follows GA, Beer PA, Scott LM, Huntly BJP, Green AR, Alexander DR. 2008.** Inhibition of the Bcl-xL deamidation pathway in myeloproliferative disorders. *The New England Journal of Medicine* **359**: 2778-2789.
- Zhao R, Oxley D, Smith TS, Follows GA, Green AR, Alexander DR. 2007.** DNA damage-induced Bcl-xL deamidation is mediated by NHE-1 antiport regulated intracellular pH. *PLoS Biology* **5**: e1.
- Zhao X, Wang D, Zhao Z, Xiao Y, Sengupta S, Xiao Y, Zhang R, Lauber K, Wesselborg S, Feng L, Rose TM, Shen Y, Zhang J, Prestwich G, Xu Y. 2006.** Caspase-3-dependent activation of calcium-independent phospholipase A2 enhances cell migration in non-apoptotic ovarian cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry* **281**: 29357-29368.
- Zhong Q, Gao W, Du F, Wang X. 2005.** Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis. *Cell* **121**: 1085-1095.
- Zhong XY, Ding JH, Adams JA, Ghosh G, Fu XD. 2009.** Regulation of SR protein phosphorylation and alternative splicing by modulating kinetic interactions of SRPK1 with molecular chaperones. *Genes & Development* **23**: 482-495.

- Zhou B, Wang Z, Zhao Y, Brautigan DL, Zhang Z. 2002.** The specificity of extracellular signal-regulated kinase 2 dephosphorylation by protein phosphatases. *The Journal of Biological Chemistry* **277**: 31818-31825.
- Zhou F, Xue Y, Yao X, Xu Y. 2006.** CSS-Palm: palmitoylation site prediction with a clustering and scoring strategy (CSS). *Bioinformatics (Oxford, England)* **22**: 894-896.
- Zhou XM, Liu Y, Payne G, Lutz RJ, Chittenden T. 2000.** Growth factors inactivate the cell death promoter BAD by phosphorylation of its BH3 domain on Ser155. *The Journal of Biological Chemistry* **275**: 25046-25051.
- Zhu J, Qiu Z, Wiese C, Ishii Y, Friedrichsen J, Rajashekara G, Splitter GA. 2005.** Nuclear and mitochondrial localization signals overlap within bovine herpesvirus 1 tegument protein VP22. *The Journal of Biological Chemistry* **280**: 16038-16044.
- Zinkel SS, Hurov KE, Ong C, Abtahi FM, Gross A, Korsmeyer SJ. 2005.** A role for proapoptotic BID in the DNA-damage response. *Cell* **122**: 579-591.
- Zong W, Li C, Hatzivassiliou G, Lindsten T, Yu Q, Yuan J, Thompson CB. 2003.** Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *The Journal of Cell Biology* **162**: 59-69.
- Zong WX, Edelstein LC, Chen C, Bash J, Gélinas C. 1999.** The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis. *Genes & Development* **13**: 382-387.

**La mitogaligine, protéine de la mort cellulaire programmée :
Localisation nucléaire, conséquences de modifications post-
traductionnelles potentielles et interaction fonctionnelle avec Mcl-1**

Résumé

La mitogaligine est une protéine codée par le gène galig, un gène inducteur de la mort cellulaire. Préalablement, il a été montré au laboratoire que cette protéine mitochondriale pouvait induire la mort cellulaire selon une voie alternative de l'apoptose. Nos études indiquent que la mitogaligine peut également être adressée au noyau où elle exerce aussi une activité cytotoxique. Le signal d'adressage nucléaire est non conventionnel et lié à une répétition d'acides aminés. Il n'est fonctionnel que si le signal de localisation mitochondriale est aboli. La fonction cytotoxique de la mitogaligine pourrait donc être régulée par son adressage subcellulaire.

De nombreuses protéines apoptotiques sont régulées par des modifications post-traductionnelles. La mitogaligine possède différents sites de phosphorylation potentiels. Plusieurs d'entre eux ont été mutés afin de mettre en évidence une éventuelle implication de cette fonction dans l'activité de la mitogaligine. La mitogaligine non mutée subit une ou plusieurs coupures protéolytiques. La mutation des résidus thréonines 29 et 73 en résidus phospho-mimétiques diminue cette protéolyse mais aussi la cytotoxicité de la protéine. Le même type de mutations de la thréonine 38 et la sérine 39 provoque une délocalisation de la protéine.

La dernière partie de la thèse s'intéresse plus particulièrement à l'interaction fonctionnelle entre la mitogaligine et Mcl-1, une protéine anti-apoptotique de la famille-Bcl-2. La coexpression de galig et Mcl-1 réduit la mort cellulaire induite par l'expression de galig et la surexpression de galig réduit la production endogène de Mcl-1. Ces résultats montrent une implication de galig dans une voie de régulation de l'apoptose. Galig pourrait donc représenter une cible thérapeutique pour restaurer la mort cellulaire dans des cellules surexprimant des protéines antiapoptotiques de la famille Bcl-2.

Mots clés : mitogaligine, mort cellulaire programmée, apoptose, cytotoxicité, localisation nucléaire, régulation, phosphorylation, interaction, membres de la famille Bcl-2.

**Mitogaligin, a programmed cell death protein: Nuclear localization,
post-translational consequences and functional interaction with Mcl-1**

Summary:

Mitogaligin is a protein encoded by galig, a cell death gene. Previously, it has been shown in our laboratory, that this mitochondrial protein induces cell death through an alternative pathway of apoptosis. In this report, we show that mitogaligin can also be addressed to the nucleus where it exhibits also a cytotoxic activity. The nuclear localization signal is not conventional, based on a repetition of amino acids, and function only if the mitochondrial localization signal is inactivated. Thus, the cytotoxicity of mitogaligin could be regulated by its subcellular localization.

A large number of apoptotic proteins are regulated by post-translational modifications. Mitogaligin has several potential sites of phosphorylation. Some of them have been mutated to highlight the possible role of phosphorylation in the mitogaligin activity. The wild type protein undergoes one or several proteolytic cuts. Replacement of the threonines 29 and 73 by phospho-mimetic residue decrease mitogaligin proteolysis and also mitogaligin cytotoxicity. The same type of mutation on threonine 38 and serine 39 induces a re-localization of mitogaligin outside mitochondria.

The last part of the manuscript focuses on the functional interaction between mitogaligin and Mcl-1, an anti-apoptotic protein of the Bcl-2 family. Coexpression of galig and Mcl-1 significantly reduces galig cell death and overexpression of galig reduces production of endogenous Mcl-1. Therefore, galig could represent a therapeutic target in order to restore cell death in cells overexpressing anti-apoptotic proteins of the Bcl-2 family.

Keywords: mitogaligin, programmed cell death, apoptosis, cytotoxicity, nuclear localization, regulation, phosphorylation, interaction, Bcl-2 family protein.