

Modifications de la perméabilité membranaire mitochondriale au cours de l'apoptose : ouverture ou rupture ?

La mitochondrie, que délimite une double barrière membranaire, est le théâtre d'échanges d'ions, de protéines et de solutés. L'isolement relatif de la mitochondrie lui permet de maintenir, au niveau de sa membrane interne, un potentiel électrochimique élevé qui est nécessaire à ses fonctions métaboliques. Le maintien de ce caractère « hermétique » lors de tels échanges est assuré, dans des conditions physiologiques normales, par une régulation étroite de la perméabilité de ces deux membranes. Des modifications majeures de la perméabilité mitochondriale semblent déterminantes dans le déclenchement de la mort cellulaire programmée.

La perméabilité mitochondriale au cours de la vie et de la mort cellulaires

La membrane externe des mitochondries est perméable à pratiquement toutes les molécules de taille inférieure à 1,5 kDa [1]. Cette perméabilité non sélective est due pour l'essentiel à la porine mitochondriale ou VDAC (*voltage dependent anionic channel*) [1]. La membrane externe abrite également un canal cationique, le PSC (*peptide sensitive channel*) [2], associé à la machinerie de translocation des protéines dans la mitochondrie [3, 4].

La membrane interne est beaucoup plus sélective : les échanges à travers cette membrane sont effectués par des transporteurs spécifiques comme par exemple le translocateur ADP/ATP (*adenine nucleotide translocator*, ANT).

Une perméabilisation rapide des membranes mitochondriales aux petites molécules peut toutefois être observée, au moins sur des mitochondries isolées. Il est communément admis que cette perméabilisation est liée à l'ouverture du PTP (pore transitoire de perméabilité). Celui-ci est composé de l'association momentanée de protéines provenant de divers compartiments mitochondriaux, dont la protéine transmembranaire de la membrane interne ANT, et celle de la membrane externe VDAC [5] (*figure 1A*).

Au cours de l'apoptose, la mitochondrie subit des modifications de la perméabilité de ses deux membranes. Les groupes de G. Kroemer et de B. Mignotte ont, les premiers, montré que la dissipation du potentiel de la membrane interne mitochondriale était un événement précoce [6, 7]. En 1996, le groupe de X. Wang a montré qu'une protéine de l'espace intermembranaire mitochondrial, le cytochrome c, est libéré dans le cytoplasme et interagit avec la protéine Apaf-1 (*apoptosis activating factor-1*), ce qui contribue à l'activation des caspases [8]. Seul l'holocytochrome c, la forme intramitochondriale liée à l'hème, semble pouvoir activer la voie des caspases [9].

L'holocytochrome c est une petite protéine basique dont la largeur minimale est d'environ 3 nm et son passage à travers la membrane externe mitochondriale paraît donc peu compatible avec un passage par la lumière du VDAC ou du PSC, au moins dans leurs formes habituelles. Des modifications majeures de la structure de la membrane externe

semblent donc nécessaires à sa libération, d'autant plus que d'autres molécules, de tailles supérieures à celle du cytochrome c, sont aussi libérées de l'espace intermembranaire au cours de l'apoptose. C'est le cas de l'AIF (*apoptosis inducing factor*), flavoprotéine de 57 kDa caractérisée par le groupe de G. Kroemer (*m/s 1999, n° 3, p. 436*), qui est redistribuée de l'espace intermembranaire mitochondrial vers le cytosol puis vers le noyau où elle induit une condensation de la chromatine [10]. L'espace intermembranaire mitochondrial abrite aussi certaines caspases, sous la forme de zymogènes, qui sont libérées et activées dans des conditions pro-apoptotiques [11, 12].

Des acteurs-clés de la perméabilisation mitochondriale : les protéines de la famille Bcl-2

Certains événements mitochondriaux sont donc caractéristiques de l'apoptose comme la dissipation du potentiel de la membrane interne mitochondriale et la libération de certains facteurs, dont le cytochrome c, à travers la membrane externe mitochondriale. On ne sait cependant pas si les modifications de perméabilité des deux membranes, externe et interne, sont corrélées et comment. Toutefois, ces modifications sont modulées par les protéines pro- ou anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (*m/s 1997, n° 5, p. 738*). Les protéines anti-apoptotiques de cette famille (Bcl-2, Bcl-xL...) sont en partie localisées au niveau de la membrane externe mitochondriale. Cette localisation empêche la dissipation du

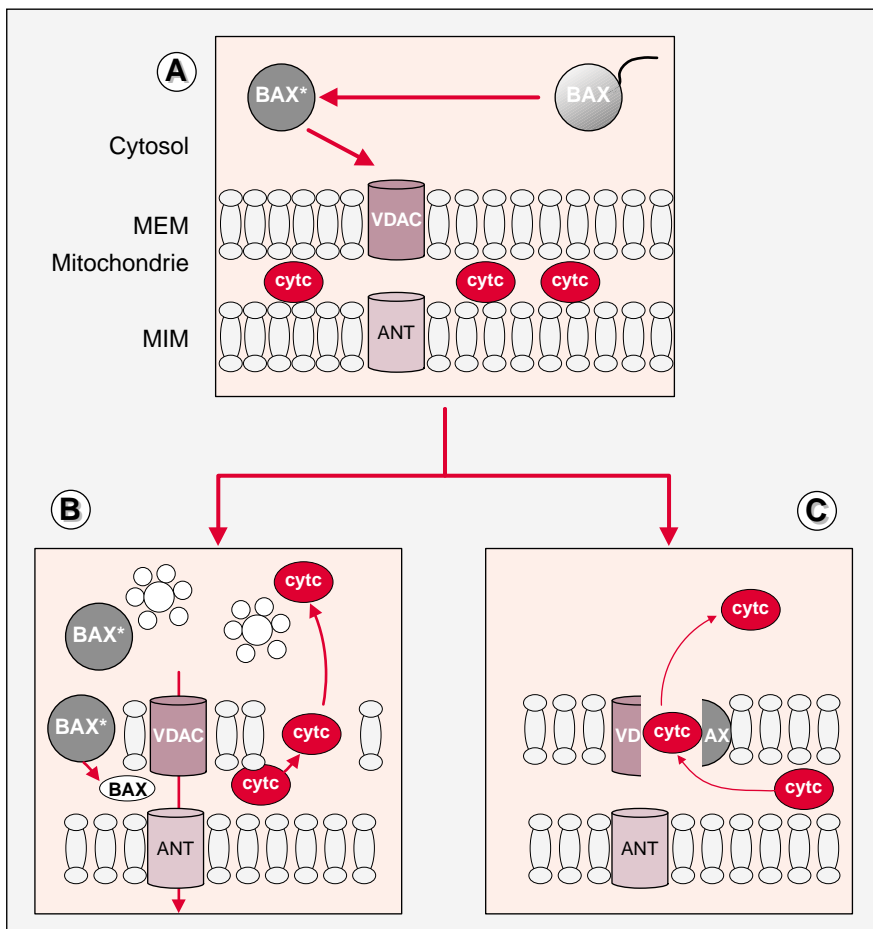


Figure 1. **Libération du cytochrome c de l'espace intermembranaire mitochondrial vers le cytosol au cours de l'apoptose.** A. La membrane externe de la mitochondrie (MEM) contient un canal appelé VDAC (voltage dependent anionic channel) qui forme, avec le transporteur ANT (adenine nucleotide translocator) et d'autres protéines mitochondriales, le pore de perméabilité transitoire. Le cytochrome c (cytc) est normalement localisé dans l'espace intermembranaire sous forme d'holocytochrome c ce qui l'empêche de franchir la membrane externe. La protéine Bax est partiellement cytosolique. Au cours de l'induction du programme apoptotique, elle subit un changement de conformation, qui lui permet de s'ancrer sous forme active (Bax*) dans les membranes mitochondriales. Deux hypothèses sont proposées pour expliquer la libération du cytochrome c sous l'action de Bax*: B. Bax* induit l'ouverture du PTP (pore transitoire de perméabilité), ce qui provoque une rupture partielle de la membrane externe mitochondriale et permet la libération non spécifique du cytochrome c. C. Bax* interagit avec le VDAC pour former un « mégacanal » qui permet le passage du cytochrome c de l'espace intermembranaire vers le cytosol.

potentiel mitochondrial ainsi que la libération de cytochrome c et d'AIF à travers la membrane externe. Inversement, il semble que les protéines pro-apoptotiques de cette famille (Bax, Bak...) puissent directement induire ces modifications [13]. L'étude de l'interaction des protéines de la

famille de Bcl-2 avec la mitochondrie semble donc déterminante pour la compréhension des mécanismes de l'apoptose.

La structure tridimensionnelle de Bcl-xL est très semblable à celle du domaine de translocation membranaire (fragment B) de la toxine diph-

térique et des domaines formant des pores des colicines A et E1 [14]. De fait, Bcl-2, Bcl-xL et Bax sont capables de s'insérer dans des bicouches lipidiques artificielles planes et de former des pores [15]. Cependant, l'étude des spécificités ioniques de ces pores ou de leurs propriétés biophysiques ne donne pas actuellement d'éclairage significatif sur leurs rôles physiologiques [15]. On peut supposer que ces protéines puissent intervenir directement dans les modifications de la perméabilité mitochondriale au cours de l'apoptose. Il reste cependant à démontrer l'existence de tels pores *in vivo* ainsi que leur rôle éventuel dans la libération du cytochrome c.

Pore transitoire de perméabilité et perméabilisation de la membrane externe: la rupture comme seule solution ?

Le groupe de Guido Kroemer a proposé, sur la base d'arguments pharmacologiques, que la dissipation du potentiel mitochondrial, observée au cours de l'apoptose, soit liée à l'ouverture du PTP [7] (*m/s* 1998, n° 12, p. 1399). La transition de perméabilité mitochondriale est en effet modulée par les protéines de la famille Bcl-2: les mitochondries isolées à partir de cellules surexprimant Bcl-2 présentent une résistance à l'ouverture du PTP; inversement, la micro-injection de la protéine Bax recombinante dans des cellules induit la dissipation du potentiel mitochondrial et l'apoptose de ces cellules, deux effets inhibés par l'ajout d'antagonistes du PTP. L'ouverture du PTP serait secondaire à une interaction physique de Bax avec l'ANT, aboutissant à une coopération fonctionnelle dépendante de la conformation de Bax [16] (*figure 1B*).

Cette ouverture permettrait à l'eau et aux solutés d'entrer dans la mitochondrie, augmentant ainsi le volume de la matrice mitochondriale, ce qui provoquerait des ruptures locales de la membrane externe mitochondriale et la libération du cytochrome c. L'étude en microscopie électronique de cellules Jurkat apoptotiques révèle en effet une augmentation du volume de certaines

mitochondries, associée à des discontinuités dans leur membrane externe [17]. La libération de protéines de l'espace intermembranaire serait donc le résultat d'un tel mécanisme de rupture, conséquence de l'ouverture du PTP et de la dissipation du potentiel mitochondrial. Cependant, l'ouverture du PTP et la libération de cytochrome c semblent parfois faire intervenir des mécanismes distincts. En effet, la dissipation du potentiel mitochondrial peut intervenir après l'activation des caspases par Apaf-1 [18] et donc vraisemblablement après la libération du cytochrome c. Cela a été confirmé dans d'autres modèles cellulaires où l'apoptose est induite par les UV ou la staurosporine : l'apparition du cytochrome c dans le cytoplasme précède la dépolarisation de la membrane mitochondriale qui semble, en revanche, dépendante de l'activation des caspases [19]. Des résultats semblables ont été observés par Zhuang *et al.* [20] qui montrent que la rupture de la membrane externe mitochondriale de monocytes humains est un phénomène tardif et secondaire à l'activation des caspases.

La possibilité d'une perméabilisation spécifique de la membrane externe sans rupture

Le groupe de Y. Tsujimoto [21], dans un article récemment publié dans la revue *Nature*, propose un autre modèle de libération du cytochrome c dans le cytoplasme au cours de l'apoptose. Il s'agit d'une perméabilisation spécifique de la membrane externe mitochondriale, secondaire à des interactions directes entre les protéines de la famille Bcl-2 et VDAC (*figure 1C*). En effet, Bcl-xL, Bax et Bac peuvent chacune interagir en solution avec VDAC (soit la protéine recombinante, soit la protéine native purifiée), ce qui exclut l'implication d'une autre protéine du complexe PTP comme l'ANT. Cette interaction modifie la perméabilité de liposomes (appréciée par l'efflux de sucrose) dans lesquels a été incorporé VDAC : Bcl-xL inhibe cette perméabilité tandis que Bax et Bak l'augmentent. De plus, Bcl-xL s'oppose à l'effet de Bax sur la perméabilité et empêche

l'interaction de Bax avec VDAC, ce qui suggère l'existence d'une compétition entre Bax et Bcl-xL pour leur interaction avec VDAC, ou d'une hétérodimérisation de ces deux protéines.

De manière importante, la coopération entre Bax et VDAC augmente la perméabilité des liposomes à l'hologlycocytochrome c. Il est peu probable que cette augmentation de perméabilité des liposomes soit secondaire à leur rupture puisque leur nombre n'est pas modifié et qu'une protéine témoin n'est pas libérée. L'absence de contamination détectable par l'ANT, et d'inhibition de l'activité du VDAC par les inhibiteurs de l'ANT, antagonistes du PTP, indiquent de plus qu'aucune protéine de la membrane interne n'est impliquée. Ces résultats suggèrent, donc, qu'au cours de l'apoptose, la membrane externe mitochondriale pourrait devenir spécifiquement perméable au cytochrome c grâce à la formation d'un « mégacanal ». Les inconnues restent toutefois nombreuses : quelle est la nature et le rôle précis de ce « mégacanal » ? Quels sont les mécanismes conduisant à sa formation ? Quelle est sa perméabilité aux autres protéines apoptogéniques ? La formation de ce canal dans la membrane externe peut-il être responsable de la rupture de la membrane externe *in fine* ou celle-ci est-elle nécessairement liée à l'ouverture du PTP ? Il est intéressant de noter qu'il existe vraisemblablement deux types de VDAC au niveau de la membrane externe mitochondriale, une forme liée au complexe PTP, et une forme libre. L'hypothèse selon laquelle l'interaction de Bax avec ces deux types de VDAC puisse conduire à des perméabilisations mitochondriales distinctes est séduisante. Ainsi, l'interaction de Bax avec le VDAC libre pourrait conduire à une libération du cytochrome c, sans rupture de la membrane externe, tandis que son interaction avec le VDAC au sein du PTP pourrait favoriser la coopération entre Bax et ANT et l'ouverture du PTP.

Conclusions

La perméabilisation de la membrane interne mitochondriale est susceptible

de conduire à un dysfonctionnement mitochondrial général. L'inhibition des voies apoptotiques, en aval des modifications mitochondriales, ne modifierait toutefois pas le destin de la cellule, puisqu'il est probable qu'un tel dysfonctionnement conduise de toute manière à la mort cellulaire, par un processus final de type nécrotique [22].

La perméabilisation de la membrane externe mitochondriale, notamment au cytochrome c, est un événement qui est susceptible d'induire l'apoptose bien que, dans certains cas, elle ne constitue pas en soi une étape suffisante à cette induction [23]. Les mécanismes conduisant à la libération du cytochrome c dans le cytoplasme sont probablement très spécifiques puisque nous avons récemment observé, qu'en dehors d'un contexte apoptotique, le cytochrome c s'accumule dans le cytoplasme de lignées cellulaires tumorales, tandis qu'un autre facteur apoptotique, l'AIF, demeure mitochondrial. De plus, dans les lignées tumorales, la libération de cytochrome c peut être insuffisante pour induire l'apoptose des cellules. En effet, l'inhibition des voies apoptotiques, en aval de la libération du cytochrome c, peut conduire au développement de tumeurs [24] et à une augmentation de la chimiorésistance des cellules tumorales.

Ainsi, la perméabilisation des membranes interne et externe des mitochondries pourrait avoir des conséquences complètement différentes sur le devenir des cellules dans un contexte pro-apoptotique. L'étude de l'interaction de VDAC avec les protéines de la famille de Bcl-2, potentiellement impliquées dans les deux types de perméabilisation mitochondriale observées au cours de l'apoptose, est essentielle à la compréhension du rôle de l'apoptose dans les processus du développement ou de la carcinogenèse ■

Remerciements

Les auteurs remercient Georges Stepien (UPRES 2038, Angers) pour la relecture critique et néanmoins amicale de ce manuscrit.

RÉFÉRENCES

1. Benz R. Permeation of hydrophilic solutes through mitochondrial outer membranes: review on mitochondrial porins. *Biochem Biophys Acta* 1994; 1197: 167-96.
2. Thieffry M, Chich JF, Goldschmidt D, Henry JP. Incorporation in lipid bilayers of a large conductance cationic channel from mitochondrial membranes. *EMBO J* 1988; 7: 1449-54.
3. Juin P, Thieffry M, Henry JP, Vallette FM. Relationship between the peptide-sensitive channel and the mitochondrial outer membrane protein translocation machinery. *J Biol Chem* 1997; 272: 6044-50.
4. Kunkele KP, Juin P, Pompa C, et al. The isolated complex of the translocase of the outer membrane of mitochondria. Characterization of the cation-selective and voltage-gated preprotein-conducting pore. *J Biol Chem* 1998; 273: 31032-9.
5. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997; 326: 1-16.
6. Vayssiere JL, Petit PX, Risler Y, Mignotte B. Commitment to apoptosis is associated with changes in mitochondrial biogenesis and activity in cell lines conditionally immortalized with simian virus 40. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 11752-6.
7. Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, et al. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med* 1996; 183: 1533-44.
8. Mignon A, Rouquet N, Joulin V. Les caspases, les protéases à cystéine de l'apoptose: un enjeu thérapeutique pour demain? *Med Sci* 1998; 14: 9-17.
9. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; 14: 479-89.
10. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999; 397: 441-6.
11. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, et al. Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med* 1999; 189: 381-94.
12. Krajewski S, Krajewska M, Ellerby LM, et al. Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 5752-7.
13. Green DR, Reed J. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281: 1309-12.
14. Muchmore SW, Sattler M, Liang H, et al. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 1996; 381: 335-41.
15. Schendel SL, Montal M, Reed JC. Bcl-2 family proteins as ion-channels. *Cell Death Diff* 1998; 5: 372-80.
16. Marzo I, Brenner C, Zamzami N, et al. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* 1998; 281: 2027-31.
17. Vander Heiden MG, Chandel NS, Williamson EK, Schumacker PT, Thompson CB. Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* 1997; 91: 627-37.
18. Yoshida H, Kong YY, Yoshida R, et al. Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell* 1998; 94: 739-50.
19. Bossy-Wetzell E, Newmeyer DD, Green DR. Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO J* 1998; 17: 37-49.
20. Zhuang J, Dinsdale D, Cohen GM. Apoptosis, in human monocytic THP.1 cells, results in the release of cytochrome c from mitochondria prior to their ultracondensation, formation of outer membrane discontinuities and reduction in inner membrane potential. *Cell Death Differ* 1998; 5: 953-62.
21. Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 1999; 399: 483-7.
22. Chautan M, Chazal G, Cecconi F, Gruss P, Golstein P. Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway. *Curr Biol* 1999; 9: 967-70.
23. Juin P, Hueber AO, Littlewood T, Evan G. c-Myc-induced sensitization to apoptosis is mediated through cytochrome c release. *Genes Dev* 1999; 13: 1367-81.
24. Soengas MS, Alarcon RM, Yoshida H, et al. Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition. *Science* 1999; 284: 156-9.

Philippe Juin
François-Marie Vallette

Inserm U. 419, IFR 26, 9, quai Moncousu, 44035 Nantes Cedex 01, France.

TIRÉS À PART

F.M. Vallette.