

Coopération mortelle entre la protéine pro-apoptotique Bax et le translocateur à adénine nucléotide pour le contrôle mitochondrial de l'apoptose

L'apoptose ou mort cellulaire programmée peut être divisée en trois phases: une phase de mise en route induite par un stimulus, une phase effectrice ou point de « non-retour » et une phase de dégradation se traduisant par d'ultimes altérations cytosoliques, membranaires et nucléaires. Depuis plusieurs années, nous avons montré que la phase effectrice de l'apoptose consistait en l'ouverture des pores de transition de perméabilité (TP) des mitochondries et la libération de protéines apoptogènes. Les protéines pro- ou anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 règlent l'apoptose grâce à des effets multiples sur les cascades d'activation de caspases, sur les potentiels cellulaires redox, et sur la fonction de barrière de perméabilité des membranes mitochondriales [1, 2]. Pour induire la mort cellulaire, la protéine pro-apoptotique Bax se redistribue du cytoplasme dans la mitochondrie et agit sur elle. Ainsi, lors de sa surexpression dans des cellules, Bax induit tous les signes mitochondriaux caractéristiques de l'apoptose, dont la dissipation du potentiel de la membrane interne mitochondriale ($\Delta\Psi_m$) et le relargage de cytochrome *c* à travers l'enveloppe mitochondriale externe.

Coopération cellulaire Bax/ANT

Les effets nucléaires et mitochondriaux de Bax sont les mêmes que ceux des agents qui ouvrent le pore de transition de perméabilité [3]. Lorsqu'ils sont micro-injectés dans des cellules, Bax recombinant et

l'atractyloside induisent la dissipation du $\Delta\Psi_m$ et l'apoptose nucléaire; l'atractyloside est une substance qui se lie au translocateur ATP/ADP (adenine nucleotide translocator, ANT), l'une des protéines du complexe formant le pore de transition de perméabilité (PTPC). On n'observe pas ces effets lorsqu'on utilise un mutant inactif de la protéine Bax (Δ IGDE) ne possédant pas le domaine essentiel pour l'homodimérisation (BH3), ou un mutant de Bax ($\Delta\alpha$ 5/6), dépourvu du domaine susceptible de former un pore (entre BH1 et BH2) [3].

Ces effets de Bax sont prévenus par trois prototypes d'inhibiteurs du pore de TP: la ciclosporine A (CsA, ligand de la cyclophiline D), le dérivé méthylé non immunosuppresseur de la CsA (m.CsA, qui est toujours capable de se lier à la cyclophiline D), et l'acide bongkrékique qui se lie à un autre site de l'ANT que l'atractyloside [3]. Ces trois inhibiteurs préviennent aussi les effets de Bax sur des mitochondries isolées: la chute du $\Delta\Psi_m$, la libération du cytochrome *c* et celle d'un facteur capable de provoquer la fragmentation d'ADN en système acellulaire (AIF *apoptosis inducing factor*) [3]. Ainsi, l'effet de Bax sur les mitochondries implique une interaction fonctionnelle étroite avec les cibles pharmacologiques de l'acide bongkrékique et de CsA.

Coopération moléculaire Bax/PTPC

Le PTPC est composé de plusieurs protéines membranaires mitochon-

driales constitutives, dont la protéine transmembranaire de la membrane interne ANT et la protéine matricielle soluble cyclophiline D [4, 5]. Isolé à partir de cerveaux de rats, le PTPC contient normalement Bax et peut être reconstitué dans des liposomes dans lesquels il règle la perméabilité de la membrane du liposome d'une manière analogue à celle du pore de transition de perméabilité dans la mitochondrie [6]. L'ajout d'atractyloside à des protéoliposomes contenant le PTPC entraîne exclusivement la libération de petites molécules (MM < 1500 Da) (*figure 1*) [6]. Lorsque le PTPC est déplété de Bax (immunodéplétion) avant reconstitution dans des liposomes, le complexe résultant ne répond plus à l'atractyloside (*figure 1*) [3]. Une réponse à l'atractyloside peut cependant être restaurée par ajout de Bax recombinant. Cette réponse est sensible à l'inhibition par CsA ou l'acide bongkrékique [3]. En outre, cet effet est spécifique de l'atractyloside car le PTPC déplété en Bax continue à répondre à d'autres inducteurs de la transition de perméabilité tels que le *t*-BHP (*tert*-butylhydroperoxide), donneur d'espèces réactives de l'oxygène, la diamide, agent oxydant des thiols, et les caspases 1 et 3 [3]. Bcl-2 prévient l'effet perméabilisateur du *t*-BHP [6, 7], même en absence de Bax [3], ce qui est en accord avec le fait que Bcl-2 peut exercer ses effets antagonistes de la mort en absence de Bax [8].

Lorsque le PTPC est purifié à partir de cerveaux de souris déficients en

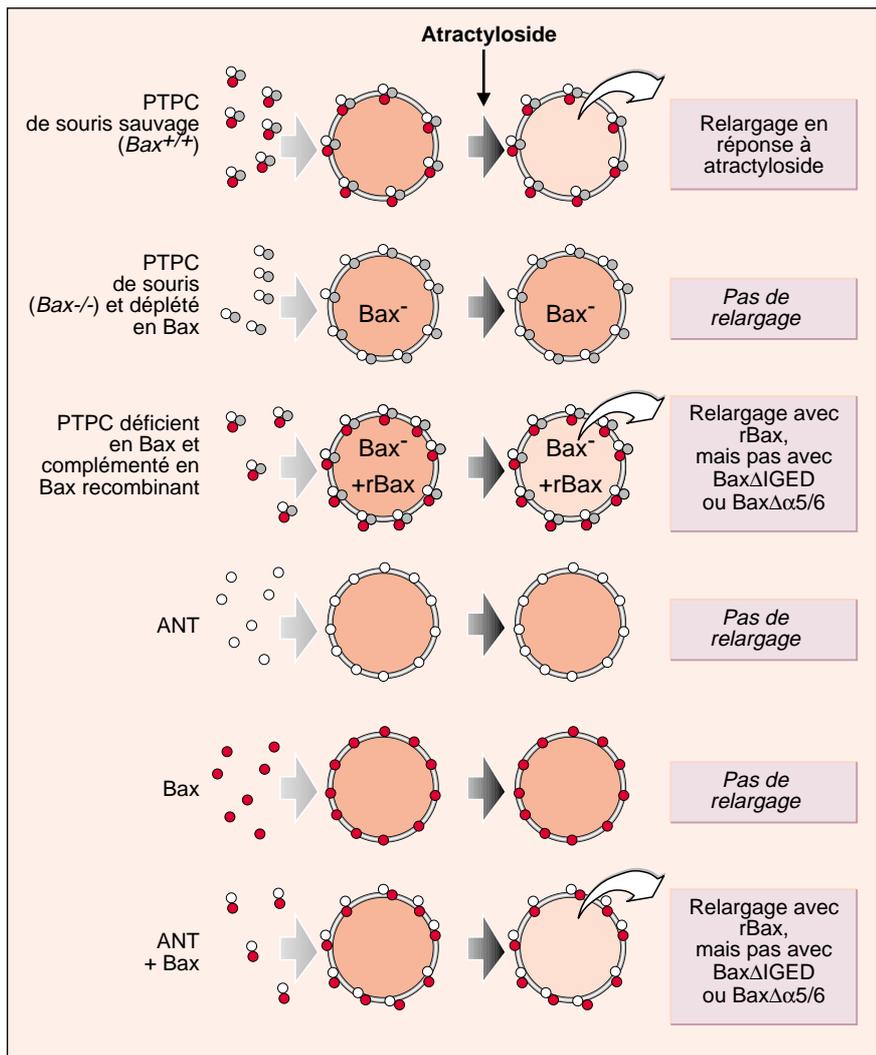


Figure 1. **Ouverture du PTPC et du complexe Bax/ANT reconstitués en liposomes.** Différents complexes protéiques purifiés ont été reconstitués dans des liposomes chargés en une molécule fluorescente, le DiOC₆(3). Sa libération après traitement des liposomes par l'atractyloside est analysée par cytométrie de flux [3]. Le complexe formant le pore de transition de perméabilité (PTPC) induit la libération de DiOC₆(3) alors que le PTPC de souris déficiente en Bax (*Bax*^{-/-}) ou le PTPC immunodéplété de Bax ne le permettent pas. La libération de DiOC₆(3) peut être restaurée par ajout de Bax recombinant (*rBax*) mais pas par les deux mutants de Bax. L'ANT seul ou Bax seul reconstitués ne permettent pas la libération de DiOC₆(3) alors que le complexe ANT/Bax le permet. Les mutants de Bax reconstitués avec l'ANT ne permettent pas la libération de DiOC₆(3).

Bax (*Bax*^{-/-}) puis reconstitué dans des liposomes, il ne répond pas à l'atractyloside, alors que le PTPC de souris témoins (*Bax*^{+/+}) y répond normalement (figure 1) [3]. Cet effet est spécifique de l'atractyloside et peut être restauré par l'ajout de Bax, mais pas par les mutants inactifs de Bax [3]. De même, l'atractyloside ne dissipe

pas le $\Delta\Psi_m$ de mitochondries de foie de souris *Bax*^{-/-} dans des conditions où il dissipe le $\Delta\Psi_m$ de mitochondries de souris témoins *Bax*^{+/+} [3]. L'inactivation des trois gènes codant respectivement pour les trois isoformes de l'ANT chez la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) ont apporté les données génétiques sous-tendant la

coopération Bax/ANT: la surexpression de Bax chez la levure sauvage réduit très fortement la formation de colonies alors que les levures déficientes en ANT résistent totalement à la mort induite par Bax [3], ce qui souligne l'interaction fonctionnelle entre Bax et ANT.

L'interaction Bax/ANT dépend de la conformation de l'ANT

Bax et ANT co-immunoprécipitent dans différents types cellulaires, dont le cerveau de rat, le foie de souris et la lignée cancéreuse humaine HT29 [3]. Dans cette dernière, l'ANT et Bcl-2 co-immunoprécipitent également [3]. Deux observations décisives indiquent que l'interaction Bax/ANT doit être directe. (1) En système double-hybride chez la levure, un fragment de l'ANT 2 interagit avec Bax, Bak, un homologue proche de Bax, et Bcl-2 [3]. (2) Bax recombinant et l'ANT purifié reproduisent certaines caractéristiques du PTPC *in vitro*, comme la réponse à l'atractyloside, ce qui n'est observé pour aucune des deux protéines seules (figure 1) [3]. Les deux mutants de Bax ne peuvent remplacer Bax, ce qui conforte l'idée que l'homodimérisation et la formation de pores sont nécessaires à l'effet pro-apoptotique de Bax [3].

Bax et ANT, chacun incorporés dans des membranes artificielles, peuvent former des pores [9-11]. Dans nos conditions expérimentales (figure 1), le complexe Bax/ANT nécessite la présence d'atractyloside pour augmenter la perméabilité des membranes des liposomes [3]. Cela est cohérent avec le fait que, dans de nombreux types cellulaires, Bax n'induit pas directement l'apoptose mais augmente la susceptibilité des cellules à l'induction de la mort par un stimulus exogène.

L'atractyloside facilite l'augmentation de perméabilité membranaire alors que l'acide bongkréique a l'effet opposé. Ainsi, lorsque l'atractyloside se lie au site externe de fixation de l'ADP de l'ANT, il le bloque dans un état particulier appelé *c-state*, qui est compatible avec l'ouverture du pore. En revanche, lorsque l'acide bongkréique se lie au site interne de fixation

de l'ATP de l'ANT, il le bloque dans l'état *m-state* ce qui prévient l'ouverture du pore par de nombreux agents pharmacologiques. Tout cela appuie donc l'hypothèse selon laquelle la conformation de l'ANT détermine la formation du pore. En outre, Bax et Bcl-2 – mais pas leurs mutants $\Delta\alpha 5/6$ – interagissent avec la membrane interne mitochondriale par un mécanisme pouvant également être inhibé par CsA [3]. Cela suggère que l'interaction de Bax avec la membrane interne dépend également de la conformation de l'ANT. Les modulateurs endogènes de la conformation de l'ANT pourraient être le rapport ATP/ADP, le Ca^{2+} , le potentiel cellulaire redox, et des métabolites d'acides gras. Ainsi, le PTPC pourrait être organisé en plusieurs unités fonctionnelles, responsables de réponses biologiques distinctes. Dans ce scénario, des paires Bax/ANT constitueraient une unité fonctionnelle particulière capable de former des pores. D'autres unités, réglées par différents effecteurs physiologiques, proviendraient de l'interaction de l'ANT avec des protéines de la membrane externe mitochondriale telles que la porine (aussi appelée *voltage dependent-anion channel* ou VDAC) ou que les protéines de la machinerie d'import. Ainsi, il est plausible que différentes combinaisons de protéines des membranes externe et interne règlent la perméabilité membranaire mitochondriale en réponse à différentes voies de transmission de signaux pro-apoptotiques.

Étant donné que Bax et ANT peuvent former des pores [3, 9-11], plusieurs modèles de coopération moléculaire Bax/ANT peuvent être proposés. Par exemple, il est concevable qu'ils forment une jonction communicante au niveau des sites de contact des membranes externe et interne. Une hypothèse alternative serait que Bax se transloque dans la membrane interne à la manière des colicines et agisse alors sur elle. En effet, après traitement par l'atractyloside, Bax se redistribue de la membrane externe dans la membrane interne et cette redistribution est inhibée par CsA [3]. Par ailleurs, la membrane externe mitochondriale pourrait subir des ruptures locales

provoquées par de subtiles variations de volume mitochondrial, puis Bax serait l'objet de changements conformationnels dépendant de l'ANT ou d'oligomérisation lui permettant de former des canaux. Ceux-ci seraient capables de transloquer des facteurs mitochondriaux membranaires, tels que le cytochrome *c*, ce qui ne peut être effectué par le PTPC en raison de sa limite d'exclusion.

En conclusion

Le PTPC contiendrait plusieurs protéines formant des canaux qui coopéreraient pour transmettre le signal d'apoptose. L'ANT et Bax coopèrent donc pour augmenter la perméabilité membranaire mitochondriale et déclencher la mort cellulaire. Cette découverte fournit un lien biochimique et fonctionnel entre le PTPC et le mode d'action des protéines réglant l'apoptose au sein de la famille Bcl-2/ Bax et ouvre de nouvelles perspectives d'investigation du contrôle de l'apoptose ■

Remerciements

Les auteurs remercient J.C. Reed, J.M. Jürgensmeier, Z. Xie, S. Matsuyama (Burnham Institute, La Jolla, CA) et M.C. Prévost (Institut Pasteur, Paris) pour leur collaboration scientifique. Les travaux présentés ont reçu le soutien de l'ANRS, de SIDACTION, de l'ARC, du Cnrs, de la LFC, de la CEE et du ministère espagnol de la Science.

Catherine Brenner

Cnrs UPRESA 6022, Université de technologie de Compiègne, BP 20529, 60205 Compiègne Cedex, France.

Cnrs UPR 420, 19, rue Guy-Môquet, 94801 Villejuif Cedex, France.

Isabel Marzo

Naoufal Zamzami

Santos A. Susin

Helena L.A. Vieira

Guido Kroemer

Cnrs UPR 420, 19, rue Guy-Môquet, 94801 Villejuif Cedex, France.

RÉFÉRENCES

1. Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med* 1997; 3: 614-620.
2. Mignotte B, Zamzami N, Petit P, Vaysière J, Kroemer G. Contrôle mitochondrial de l'apoptose: la mort cellulaire programmée est-elle apparue à la suite de l'événement endosymbiotique à l'origine des mitochondries? *Med Sci* 1998; 14: 54-60.
3. Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jürgensmeier JM, Susin SA, Vieira HLA, Prévost, MC, Xie Z, Matsuyama S, Reed JC, Kroemer G. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* 1998; 281: 2027-31.
4. Zoratti M, Szabò I. The mitochondrial permeability transition. *Biochem Biophys Acta Rev Biomembranes* 1995; 1241: 139-76.
5. Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, Woodfield KY. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1366: 79-94.
6. Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Susin SA, Beutner G, Brdiczka D, Rémy R, Xie ZH, Reed JC, Kroemer G. The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and Bcl-2-related proteins. *J Exp Med* 1998; 187: 1261-71.
7. Zamzami N, Marzo I, Susin SA, Brenner C, Larochette N, Marchetti P, Reed JC, Kofler R, Kroemer G. The thiol – crosslinking agent diamide overcomes the apoptosis-inhibitory effect of Bcl-2 by enforcing mitochondrial permeability transition. *Oncogene* 1998; 16: 1055-65.
8. Zamzami N, Brenner C, Marzo I, Susin SA, Kroemer G. Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins. *Oncogene* 1998; 16: 2265-82.
9. Schlesinger PH, Gross A, Yin XM, Yamamoto K, Saito M, Waksman G, Korsmeyer SJ. Comparison of proapoptotic Bax and antiapoptotic Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 11357-62.
10. Brustovetsky N, Klingenberg M. Mitochondrial ADP/ATP carrier can be reversibly converted into a large channel by Ca^{2+} . *Biochemistry* 1996; 35: 8483-8.
11. Ruck A, Dolder M, Wallimann T, Brdiczka D. Reconstituted adenine nucleotide translocase forms a channel for small molecules comparable to the mitochondrial permeability transition pore. *FEBS Lett* 1998; 426: 97-101.

TIRÉS À PART

C. Brenner.