

Approches génétiques des mécanismes moléculaires de mort cellulaire programmée chez *Dictyostelium*

par David Lam & Pierre Golstein

Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, INSERM-CNRS-Université de la Méditerranée, Parc Scientifique de Luminy, Case 906, 13288 Marseille Cedex 9, France.

E-mail : lam@ciml.univ-mrs.fr ou golstein@ciml.univ-mrs.fr

Reçu le 25 janvier 2005

RÉSUMÉ

Les morts cellulaires indépendantes des caspases ont été découvertes dans de nombreuses espèces dont l'Homme. Cependant, les mécanismes qui les gouvernent sont encore relativement peu connus. Nos travaux actuels portent sur un organisme modèle, le protiste *Dictyostelium discoideum*, qui présente au cours de son développement un type de mort caspase-indépendant. En milieu riche, *Dictyostelium* se multiplie comme un organisme unicellulaire, mais en condition de carence, les cellules de *Dictyostelium* s'agrègent, se différencient et subissent un développement aboutissant à une structure multicellulaire, appelée sorocarpe, composée d'une masse de spores soutenue par une tige. Les cellules de la tige sont considérées comme mortes sur la base de non-repousse en milieu riche et se trouvent être vacuolisées. Il s'agit donc d'une mort cellulaire programmée vacuolaire développementale et, de plus, caspase-indépendante puisqu'il n'existe pas de gènes *caspases* dans le génome de *Dictyostelium*. Afin d'étudier cette mort

cellulaire dans un contexte expérimental plus favorable, un protocole *in vitro* a été adapté, qui nous a permis de décrire la cascade d'évènements morphologiques au cours de cette mort. Par une approche de mutagenèse insertionnelle, suivie d'une sélection appropriée de mutants potentiellement résistants à la mort, nous tentons actuellement d'établir la cascade d'évènements moléculaires aboutissant à la mort vacuolaire des cellules de *Dictyostelium*. Une meilleure compréhension des voies de morts caspases-indépendantes contribuera, à long terme, à l'élaboration de nouveaux traitements visant à contrôler les différents types de morts cellulaires dans les cas de cancers ou de maladies neurodégénératives. Dans cette courte revue, nous rappellerons très brièvement quelques généralités sur le développement de *Dictyostelium* et nous insisterons sur les particularités de la mort cellulaire programmée chez *Dictyostelium*, et sur les moyens génétiques mis en oeuvre pour élucider les mécanismes moléculaires.

SUMMARY Genetic approaches to molecular mechanisms of programmed cell death in *Dictyostelium*

Caspase-independent cell deaths have been observed in many species including the human. However, the molecular mechanisms which govern them are largely unknown. Our present work makes use of a model organism, the protist *Dictyostelium discoideum*, which displays a caspase-independent cell death during its development. In rich medium, *Dictyostelium* multiplies vegetatively as a unicellular organism, but in starvation conditions, *Dictyostelium* cells aggregate, differentiate and morphogenize into a multicellular structure, called sorocarp, containing a mass of spores supported by a stalk. Cells in the stalk are considered dead on the basis of non-regrowth in a rich medium and are vacuolized. This programmed cell death is therefore developmental and vacuolar, and in addition, caspase-independent since the *Dictyostelium* genome does not contain *caspases* genes. In order to

study in detail this cell death without induction of development, an *in vitro* experimental protocol has been adopted, which enabled us to describe the cascade of morphological events during this cell death. An insertional mutagenesis approach, followed by appropriate selection or screening of mutants potentially resistant to death, attempted at establishing the cascade of molecular events leading to vacuolar death of *Dictyostelium* cells. A better understanding of alternative death pathways may allow to control different types of cell deaths in the cases of cancers or neurodegenerative diseases. In this short review, we will discuss briefly some generalities about the development of *Dictyostelium* in starvation conditions, and we will focus on the course of programmed cell death in *Dictyostelium* and on the genetic tools used to elucidate the corresponding molecular mechanisms.

INTRODUCTION

La mort cellulaire programmée (MCP) est essentielle pour le développement normal et pour le maintien de l'homéostasie chez les organismes multicellulaires. Selon des critères morphologiques, la MCP peut être apoptotique, autophagique/vacuolaire ou nécrotique avec également des aspects intermédiaires (Leist & Jaattela, 2001 ; Assuncao Guimaraes & Linden, 2004).

La MCP apoptotique a été la première décrite mais aussi la plus étudiée (Kerr *et al.*, 1972 ; Hengartner, 1994 ; Danial & Korsmeyer, 2004). Les cellules apoptotiques sont caractérisées par une condensation de la chromatine et du cytoplasme ainsi que par une fragmentation de l'ADN. Le mécanisme moléculaire conduisant à ce tableau morphologique est généralement dépendant de l'activation de cystéines protéases appelées caspases qui n'ont été identifiées que chez les animaux (Uren *et al.*, 2000). Néanmoins, chez ces derniers, il existe également d'autres types de morts cellulaires, caspases-indépendantes, qui peuvent être révélées en bloquant expérimentalement ou génétiquement la voie apoptotique dépendante des caspases. Une MCP de type nécrotique a été ainsi mise en évidence en utilisant des inhibiteurs de caspases ou en inactivant des gènes *caspases* (Vercammen *et al.*, 1998 ; Chautan *et al.*, 1999 ; Kitanaka & Kuchino, 1999). Aussi, une mort cellulaire de type autophagique a été mise en évidence chez des souris déficientes pour les gènes *Bak* et *Bax* (Shimizu *et al.*, 2004), ou bien pour les gènes *caspase 3* et *caspase 9* (Oppenheim *et al.*,

2001). Ce type de mort cellulaire est caractérisé par la présence d'autophagosomes et/ou de vacuoles. La mort vacuolaire autophagique a été également décrite dans des circonstances pathologiques notamment dans le cadre de cancers (Kanzawa *et al.*, 2003) et de maladies neurodégénératives (Clarke, 1990 ; Shintani & Klionsky, 2004).

Ces données mettent en évidence l'existence de plusieurs types de mort cellulaire dans le règne animal et montrent également qu'il peut exister plus d'un type de mort pour une même cellule. Cependant, l'étude des mécanismes caspases indépendants se révèle être très délicate chez les animaux, faute de méthodes de détection et d'analyse de ces types de mort non apoptotiques, par la difficulté de dissocier clairement les voies moléculaires à l'origine de chacune de ces morts et la prévalence de l'apoptose.

Afin d'étudier en détail certains mécanismes moléculaires responsables d'une mort cellulaire caspase indépendante, nous avons choisi d'utiliser un modèle d'étude non animal, le protiste *Dictyostelium discoideum* qui, dans des conditions de carence montre une mort cellulaire programmée caspase indépendante de type vacuolaire/auto-phagique (Cornillon *et al.*, 1994 ; Golstein *et al.*, 2003).

DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM

Dictyostelium est une moisissure, Protiste Eucaryote qui se nourrit de bactéries et se multiplie alors sous forme d'organisme unicellulaire. Mais, de manière éton-

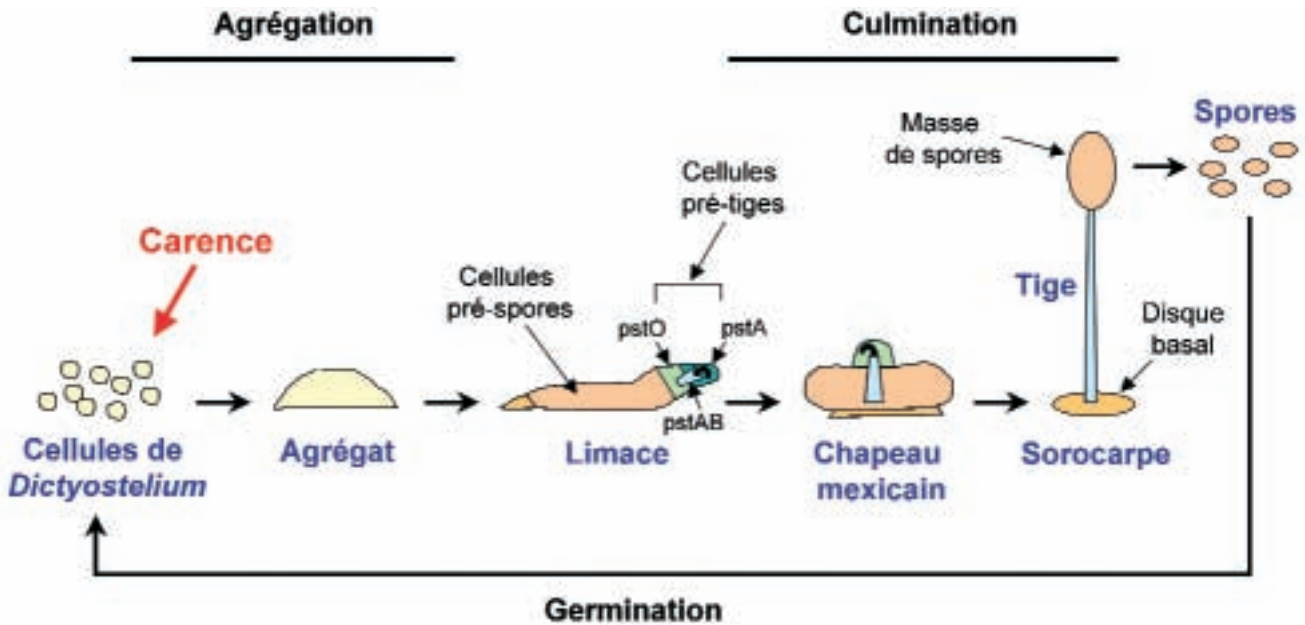


FIG. 1. – Représentation schématique du développement de *Dictyostelium*.

En condition de carence, les cellules vont se déplacer puis s'agréger pour former un monticule lâche de cellules. Cet agrégat va s'allonger puis former une limace capable de se déplacer. Dans cette structure de limace, il existe deux populations majeures de cellules : une population de cellules pré-tiges (pstA, pstO et pstAB) qui sont à l'origine des cellules vacuolées de la tige, et une population de cellules pré-spores qui vont devenir des spores. Lors de la culmination, les cellules pré-tiges vont s'invaginer pour former la tige. Au final, le déplacement des différentes populations de cellules va aboutir à la formation d'un sorocarpe mature constitué d'une masse de spores soutenue par une tige. Les cellules de la tige sont mortes. Les spores pourront redonner, après germination en conditions plus favorables, des cellules végétatives.

nante, lorsque des cellules de *Dictyostelium* se retrouvent en condition de carence, elles s'agrègent puis se transforment en une structure multicellulaire organisée, appelée sorocarpe (Fig. 1). Chaque sorocarpe peut atteindre jusqu'à 2 mm de hauteur et se compose d'une masse de spores soutenue par une tige. Les spores peuvent être disséminées puis, si elles rencontrent un milieu riche, subir une germination pour redonner des cellules végétatives. Ce qui nous intéresse particulièrement au laboratoire est ce qui se passe au niveau de la tige. En effet, des cellules de la tige replacées en milieu riche sont dans l'incapacité de se multiplier (Whittingham & Raper, 1960). Il s'agit donc d'une mort développementale au moins dans le sens d'une inhibition de la clonogénicité. D'autre part, ces cellules tiges sont massivement vacuolisées (George *et al.*, 1972). L'étude de la mort cellulaire *in vivo* étant très malaisée, un système expérimental *in vitro* très réductionniste a été mis en place afin de mimer en monocouche la différenciation de cellules végétatives en cellules tiges (Kay *et al.*, 1979). Cette différenciation en cellules tiges *in vitro* résulte de l'action séquentielle d'au moins deux facteurs en condition de carence, l'AMP cyclique dans un premier temps, puis le facteur de différenciation DIF-1.

DIFFÉRENTES ÉTAPES DU DÉVELOPPEMENT DE *Dictyostelium*

Au cours de la carence, les cellules de *Dictyostelium* synthétisent de l'AMPc qui agit comme chimioattractant extracellulaire. Initialement, quelques cellules vont libérer dans le milieu extracellulaire de l'AMPc qui va se lier aux récepteurs cAR à la surface des cellules voisines. Ces dernières vont répondre à ce signal en produisant et sécrétant un nouveau pulse d'AMPc tout en se déplaçant en direction de la source du premier pulse d'AMPc. Le deuxième pulse d'AMPc va à son tour attirer d'autres cellules et ainsi de suite, ce qui va créer un gradient d'AMPc avec une forte concentration au niveau des cellules à l'origine du premier signal AMPc. Les cellules en déplacement vers cette zone vont alors s'agréger et adhérer les unes aux autres, aboutissant à la formation d'une structure multicellulaire tri-dimensionnelle (Fig. 1).

A partir de ce monticule lâche de cellules va se former une structure appelée « limace » qui est capable de se déplacer. Selon leur devenir, nous pouvons y distinguer deux types majeurs de cellules, les cellules pré-tiges localisées à l'avant de la limace et les cellules pré-spores. Cette détermination du devenir cellulaire semble être sous le contrôle combinatoire de l'AMPc et du DIF-1 (Berks & Kay, 1990). Il existe différentes sous-classes de cellules pré-tiges selon l'expression de certains marqueurs spécifiques dont *ecmA* et *ecmB*, qui sont des protéines de matrice extracellulaire (Jermyn *et al.*, 1989). Les cellules qui vont occuper la zone la plus antérieure de la limace sont appelées cellules pstA parce qu'elles expriment fortement le gène *ecmA*. Plus en arrière sont

localisées des cellules pstO qui expriment le gène *ecmA* à un niveau plus faible. Enfin, un troisième type cellulaire, les cellules pstAB expriment à la fois les gènes *ecmA* et *ecmB* et sont situées entre les deux autres zones. Les cellules pré-spores, postérieures, n'expriment pas ces marqueurs *ecmA* et *ecmB*.

Après une période de déplacement, la limace va se compacter puis former une structure en forme de chapeau mexicain, qui est transitoire et qui va rapidement entrer en phase de culmination. Les cellules pré-tiges vont alors s'invaginer pour constituer la tige, se vacuoliser, produire de la cellulose puis finalement mourir. Il est à noter que l'inactivation du gène de la cellulose synthase entraîne un phénotype développemental anormal dans lequel l'intégrité structurale de la tige est très affectée (Blanton *et al.*, 2000).

MORT CELLULAIRE PROGRAMMÉE CHEZ *Dictyostelium*

Généralités

Le génome de *Dictyostelium* est dépourvu de gènes caspases (Uren *et al.*, 2000). La mort cellulaire programmée chez *Dictyostelium* est donc caspase-indépendante, une conclusion cohérente avec le fait que des inhibiteurs de caspases n'inhibent pas cette mort cellulaire (Olie *et al.*, 1998). De plus, cette MCP ne présente pas la fragmentation de l'ADN qui est une composante morphologique de la mort apoptotique (Cornillon *et al.*, 1994). Cette mort cellulaire développementale qui a lieu spécifiquement dans les cellules de tiges est morphologiquement décrite comme vacuolaire (George *et al.*, 1972). La différenciation en cellules tiges semblent résulter de l'action séquentielle d'au moins deux facteurs principaux en condition de carence : l'AMP cyclique (AMPc), et le DIF-1, un morphogène naturellement produit par les cellules pré-spores au cours du développement (Kay & Thompson, 2001). Bien que l'AMPc soit requis dans la différenciation en cellules tiges vacuolées, nous ne connaissons pas son rôle exact dans ce processus.

Le DIF-1 est une petite molécule (alkyl phénone dichlorée) qui agit sur les cellules carencées soumises à l'AMPc en promouvant leur différenciation en cellules tiges (Town *et al.*, 1976; Town & Stanford, 1979; Sobolewski *et al.*, 1983; Morris *et al.*, 1987). Le DIF-1 induit l'expression des marqueurs pré-tiges tels que *ecmA* et *ecmB*, et réprime la transcription des gènes pré-spores comme par exemple *cotA*, *cotB* et *cotC* (Fosnaugh & Loomis, 1991). En effet, une souche mutante appelée HM44, qui ne produit que de très faibles quantités de DIF-1, n'est pas capable d'exprimer les marqueurs *ecmA* et *ecmB* à moins que du DIF-1 soit ajouté (Kopachik *et al.*, 1983), démontrant le rôle de DIF-1 dans la différenciation des cellules pré-tiges. Au niveau de sa régulation, une enzyme cytoplasmique induite par le DIF-1 lui-même, la DIF-1 déchlorinase, permet d'inactiver DIF-1 (Insall *et al.*, 1992). Il a été suggéré que cette boucle

d'autorégulation pourrait faire partie intégrante du mécanisme par lequel les cellules sont destinées à devenir des cellules spores ou tiges.

Hormis le fait que le DIF-1 semble induire une lente augmentation des niveaux de Ca^{2+} intracellulaire (Schaap *et al.*, 1996) et également réguler la translocation nucléaire de facteurs de transcription STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) (Fukuzawa *et al.*, 2001 ; Fukuzawa *et al.*, 2003), rien n'est encore réellement connu quant à l'action du DIF-1 dans les mécanismes moléculaires qui mènent à la différenciation en cellules tiges mortes/vacuolisées. Compte tenu de sa structure (Kay, 1998), il est possible que le DIF-1 diffuse librement à travers la membrane plasmique. DIF-1 pourrait avoir un récepteur intracellulaire (Insall & Kay, 1990) comme c'est le cas pour les hormones stéroïdes (Farach-Carson & Davis, 2003). Un facteur de transcription de type bZIP/bRLZ semble être requis dans la réponse cellulaire au DIF-1 à travers l'expression de gènes cibles (Thompson *et al.*, 2004).

Aspects phénoménologiques

Compte tenu des difficultés à étudier *in vivo* la mort des cellules des tiges, un système expérimental *in vitro* a été utilisé au laboratoire (Cornillon *et al.*, 1994) à partir de données préexistantes (Kay, 1987) permettant une différenciation de cellules HMX44A végétatives en cellules mortes vacuolées en monocouche. La procédure standard consiste tout d'abord à mettre des cellules végétatives en milieu de carence supplémenté en AMPc 3mM pendant 8 heures. Il est à noter que cette incubation en AMPc est nécessaire, mais insuffisante à elle seule pour la mort ultérieure des cellules. Les cellules sont ensuite lavées puis incubées pendant une durée de temps variable soit en milieu de carence seul soit en milieu de carence

en présence de DIF 100nM. Cette approche expérimentale *in vitro* a permis de décrire une cascade d'évènements qui aboutit à la vacuolisation et la mort des cellules (Cornillon *et al.*, 1994 ; Levraud *et al.*, 2003) (Fig. 2). Tout d'abord, dès 8-16 h après l'addition de DIF, les cellules acquièrent une morphologie dite en « raquette », qui se traduit par une forte mobilité et une importante polarisation avec une moitié antérieure de la cellule d'aspect amorphe contenant de l'actine F polymérisée, et une moitié postérieure contenant la majorité, voire l'ensemble des organites cellulaires. Ensuite, autour de 15-26 h, ces cellules « raquettes » vont s'arrondir et acquérir une coque de cellulose. A cette étape, les cellules rondes sont irréversiblement mortes puisque même remises en milieu riche, elles sont incapables de se multiplier. Il s'agit d'une étape cruciale dans la mort clonogénique des cellules. Par la suite, des vacuoles vont apparaître progressivement dans ces cellules rondes qui fusionnent en une unique vacuole occupant la quasi-totalité du volume des cellules. Au final, vers 36-48 h, nous assistons à la mort dite « membranaire » c'est à dire à la rupture de la membrane externe des cellules vacuolées.

APPROCHES GÉNÉTIQUES DU MÉCANISME DE MCP CHEZ *Dictyostelium*

Dictyostelium présente un génome de 34 Mb récemment séquencé en totalité et haploïde ce qui le rend très approprié à des expériences de mutagenèse. De plus, étant donné que le cycle de vie de *Dictyostelium* est divisé en deux phases distinctes, la phase végétative et la phase développementale, l'inactivation de gènes requis seulement au cours du développement, comme les gènes impliqués dans la voie de mort vacuolaire lors de la for-

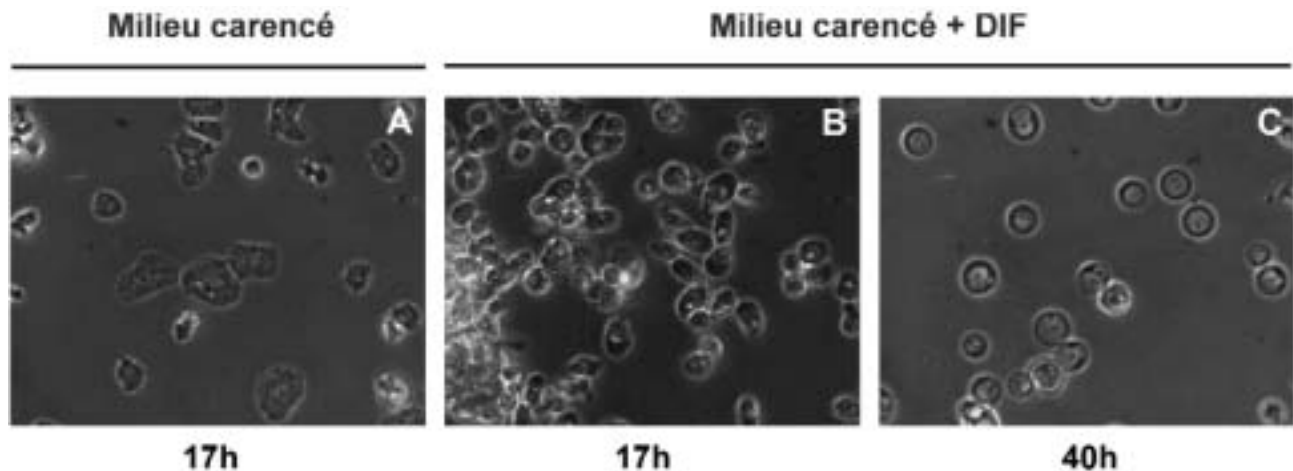


FIG. 2. – Évènements morphologiques au cours de la mort autophagique chez *Dictyostelium*.

Les cellules HMX44A végétatives sont lavées en milieu carencé, puis incubées 8h dans un milieu carencé en présence de AMPc 3mM. Les cellules sont à nouveau lavées puis incubées soit en milieu carencé seul (A), soit en milieu carencé supplémenté en DIF-1 100 nM (B, C). En milieu carencé seul, beaucoup de cellules acquièrent une morphologie plate avec des filopodes qui persistent quelques jours (A). La présence de DIF-1 induit une différenciation des cellules végétatives vers des cellules vacuolées. Après 8-16 h, les cellules acquièrent une morphologie dite en raquette puis s'arrondissent (B). Puis après 24 h, les cellules rondes se vacuolisent massivement (C).

mation de la tige, n'affectera nullement la multiplication végétative des cellules mutantes correspondantes. De tels mutants sont donc des mutants conditionnels. Nous utilisons actuellement deux types d'approches génétiques afin d'identifier les molécules impliquées dans cette mort vacuolaire. La première consiste à inactiver de manière ciblée des gènes susceptibles d'avoir un rôle dans la mort cellulaire d'après des résultats de biologie cellulaire obtenus dans le laboratoire ou provenant d'autres systèmes modèles. La deuxième consiste à inactiver des gènes de manière aléatoire puis à sélectionner les mutants obtenus pour leur résistance à la mort. Nous utilisons pour cette deuxième approche une variante de la mutagenèse insertionnelle, appelée REMI (Restriction Enzyme-Mediated Integration) (Kuspa & Loomis, 1992). De manière simplifiée, cette technique consiste à électroporer les cellules *Dictyostelium* par un plasmide, contenant un gène de résistance à une drogue (blasticidine), qui va s'insérer au hasard dans le génome et donc inactiver certains gènes. Ce qui est très intéressant, c'est que le plasmide ainsi que ses séquences flanquantes correspondant au gène inactivé peuvent être récupérés. Ce sauvetage du plasmide permet d'une part d'identifier le gène inactivé et d'autre part d'utiliser ce plasmide flanqué des séquences de ce gène comme vecteur de recombinaison homologue pour confirmer le phénotype chez d'autres souches par exemple. L'efficacité de cette méthode dépend impérativement de la sélection post-mutagenèse, comme décrit plus loin.

Mutagenèse ciblée de gènes candidats

Dans le laboratoire, nous avons étudié l'impact sur la mort cellulaire de l'inactivation des gènes codant pour la cellulose synthase, la paracaspase ou la protéine kinase *atg-1*.

Comme la différenciation terminale des cellules de la tige s'accompagne d'une synthèse importante de cellulose, nous avons émis l'hypothèse que la formation de la coque de cellulose pouvait être à l'origine de la mort clonogénique en exerçant une contrainte mécanique empêchant la multiplication des cellules. Il existe un seul gène de cellulose synthase (*dcsA*) chez *Dictyostelium* (Blanton *et al.*, 2000), ce qui a facilité l'obtention de mutants incapables de synthétiser de la cellulose. Différents tests *in vitro* montrent que l'inactivation de ce gène n'empêche pas les cellules de mourir avec la même cinétique que les cellules sauvages (Levraud *et al.*, 2003). Ainsi, la formation de la coque de cellulose n'est pas responsable de la mort cellulaire clonogénique chez *Dictyostelium*.

Les caspases font partie d'une famille de molécules incluant également les métacaspases et les paracaspases (Uren *et al.*, 2000). Alors que les métacaspases semblent avoir un rôle dans la mort cellulaire programmée, notamment chez les plantes (Bozhkov *et al.*, 2004 ; Suarez *et al.*, 2004) et la levure (Madeo *et al.*, 2002), on ne sait pas si les paracaspases ont un rôle dans la MCP. Chez l'Homme et la souris, la paracaspase MALT1 est nécessaire à l'activation de NF- κ B induite par le TCR chez les lymphocytes T (Ruefli-Brasse *et al.*, 2003 ; Ruland *et al.*, 2003 ; Che *et al.*, 2004), mais cette fonction ne

semble pas faire intervenir le domaine de type caspase (voir la discussion dans Che *et al.*, 2004). Récemment, le domaine catalytique de la paracaspase humaine a été caractérisé (Snipas *et al.*, 2004). Comme le protiste *Dictyostelium* ne possède ni gènes caspases, ni gènes métacaspases mais seulement un gène codant pour une paracaspase (Uren *et al.*, 2000), nous nous sommes demandé si cette paracaspase était impliquée dans la MCP chez *Dictyostelium*. Afin de répondre à cette question, des mutants insertionnels pour la paracaspase ont été obtenus par recombinaison homologue dans quatre souches différentes de *Dictyostelium* (Roisin-Bouffay *et al.*, 2004). L'étude de ces mutants n'a pas montré d'anomalies de la mort cellulaire *in vivo* et *in vitro*, ce qui a permis de conclure que la paracaspase n'est pas nécessaire au déroulement normal de la mort cellulaire programmée chez *Dictyostelium*.

Enfin, compte tenu des études en microscopie électronique qui montrent autophagie et vacuolisation chez *Dictyostelium* en situation de carence (de Chastellier & Ryter, 1977), des cellules HMX44A ont été inactivées pour le gène d'autophagie *atg-1* afin de déterminer une éventuelle implication de l'autophagie dans ce mécanisme de mort vacuolaire. L'induction de mort *in vitro* chez ces cellules n'entraîne pas de vacuolisation (contribuant à démontrer que *atg-1* est nécessaire à la vacuolisation), mais d'une manière inattendue, ces cellules meurent quand même avec une morphologie particulière (Kosta *et al.*, 2004). Ce système dans lequel le mécanisme d'autophagie est globalement inactivé a donc permis de mettre en évidence une mort cellulaire de type non autophagique et non-vacuolaire. Une étude plus approfondie de cette voie de mort chez *Dictyostelium* est actuellement en cours.

Plus généralement, cette approche constitue un « émonage génétique » de la mort cellulaire chez *Dictyostelium*, nous permettant maintenant de nous focaliser sur un noyau dur mécanistique de mort cellulaire, débarrassé d'épiphénomènes comme la vacuolisation et la coque de cellulose.

Mutagenèse insertionnelle au hasard

Première approche

Une première stratégie pour identifier les gènes impliqués dans le mécanisme de mort cellulaire programmée chez *Dictyostelium* reposait sur une mutagenèse insertionnelle aléatoire dans des cellules HMX44A (Fig. 3). Comme dit précédemment, cette souche synthétise très peu de DIF-1 et n'a pas la capacité de se développer. Après mutagenèse insertionnelle REMI, les mutants sont sélectionnés tout d'abord sur leur résistance à la blasticidine. Ensuite, ces mutants sont de nouveau sélectionnés sur leur résistance à la mort cellulaire induite *in vitro* par carence suivie d'addition de DIF-1. Finalement, les cellules survivantes vont se multiplier après leur transfert dans un milieu riche. Cependant, après induction de mort *in vitro*, 10 à 20 % de cellules HMX44A sauvages survivent et repoussent lorsqu'on les remet en milieu riche.

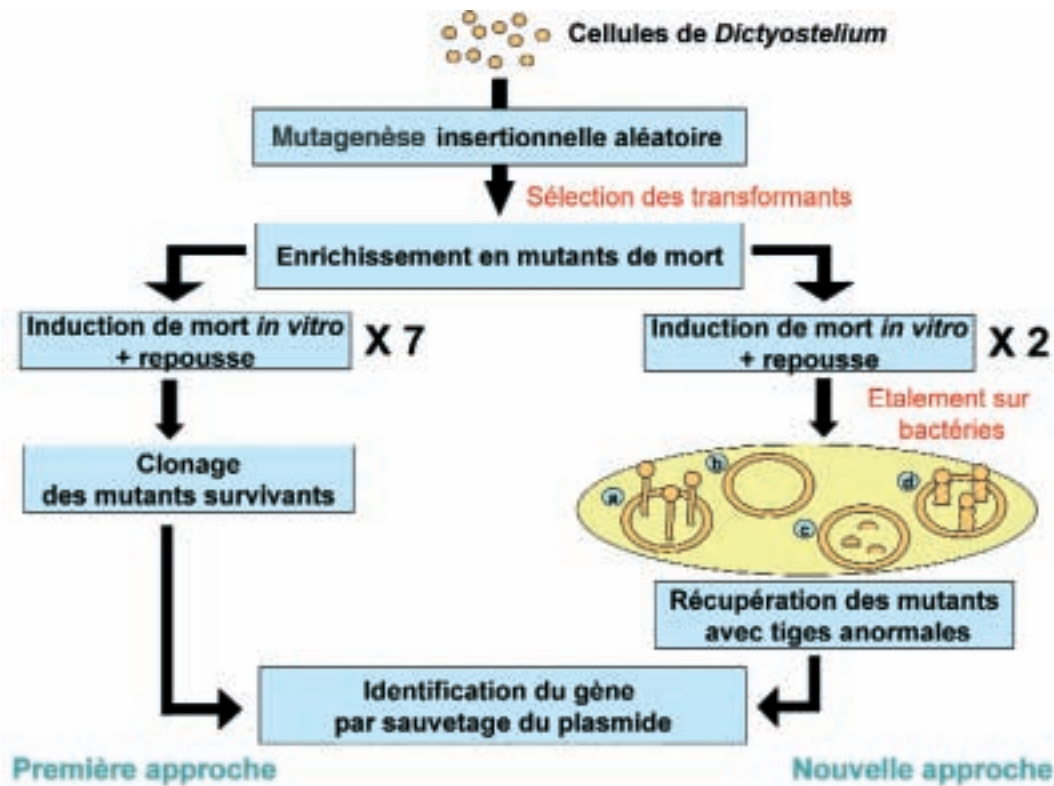


FIG. 3. – Différentes approches par mutagenèse d'identification des molécules impliquées dans la MCP chez *Dictyostelium*.

L'obtention des mutants est réalisée par mutagenèse insertionnelle au hasard. Dans une première approche (gauche), les cellules HMX44A mutantes sont soumises à sept cycles successifs d'induction de mort puis de repousse en milieu riche afin de faire émerger les mutants résistants à la mort par rapport au bruit de fond. Les mutants résistants sont clonés par dilution limite. Dans notre nouvelle approche (droite), les cellules mutantes JH10 ou DH1 sont soumises à deux cycles d'induction de mort et de repousse afin d'enrichir en mutants résistants à la mort. Les cellules survivantes sont étalées sur bactéries. Chaque cellule va donner une plaque à l'intérieur de laquelle les cellules se multiplient clonalement puis se développent. Quatre phénotypes majeurs peuvent être observés : des plages de sorocarpes à phénotype sauvage (a), des plages sans agrégats (b), des plages avec uniquement des agrégats (c), et des plages de sorocarpes à phénotype anormal (d). Les clones qui se développent en sorocarpe et qui présentent une anomalie au niveau de la tige sont récupérés à partir des plages. Dans les deux approches, les mutants sélectionnés sont testés par induction de mort en monocouche. Les gènes inactivés des mutants présentant un phénotype de mort différent du sauvage peuvent être identifiés par sauvetage du plasmide puis séquençage.

Ainsi, pour permettre aux mutants d'émerger de ce bruit de fond relativement important, environ sept cycles successifs d'induction de mort cellulaire et de repousse sont réalisés. Au terme de cette première vague de mutagenèse, plusieurs mutants d'insertion correspondant au phénotype « résistance à la mort » ont été obtenus. Cependant, ils ont permis d'identifier uniquement des molécules de signalisation précoce telles qu'une phosphatase de MAPK, un homologue de Rab ou encore DlrA, une molécule qui contrôle l'expression de PKA.

Pour expliquer ce résultat, il faut rappeler que la carence et la signalisation AMPc, dont les acteurs sont très nombreux, sont nécessaires à la mise en route de la différenciation en cellules mortes vacuolisées. Il est donc vraisemblable que la majorité des mutants résistants à la mort correspondent à des inactivations de gènes qui sont impliqués non pas dans le mécanisme de mort dépendant du DIF proprement dit, mais plutôt dans la signalisation initiale. Afin d'obtenir des mutants de mécanisme plutôt

que des mutants de signalisation, nous avons dû repenser le type de sélection qui suit la mutagenèse.

Nouvelle approche

La mutagenèse aléatoire d'insertion est maintenant suivie d'un criblage développemental (Fig. 3). Cette méthode de criblage est basée sur l'hypothèse suivante : l'inactivation de gènes impliqués dans le mécanisme de la mort cellulaire développementale devrait entraîner une morphologie anormale des tiges. En pratique, nous utilisons des souches de *Dictyostelium* capables de développement, telles que les souches JH10 et DH1. Bien qu'elles produisent du DIF, contrairement à HMX44A, ces cellules se prêtent convenablement aux inductions de mort en monocouche. La procédure implique, après la mutagenèse, d'abord une sélection, puis un criblage. Ainsi, les cellules issues de la mutagenèse vont d'abord être soumises à deux cycles successifs d'induction de mort *in vitro*, pour enrichir en cellules résistantes à la

mort. Puis les cellules survivantes sont étalées sur bactéries afin d'observer leur développement *in vivo*. Chaque mutant étalé se multiplie puis forme une plaque clonale à l'intérieur de laquelle les cellules en carence initient un développement normal, ou altéré à différents stades, selon le gène inactivé par insertion du plasmide. Ce criblage a le grand avantage de pouvoir différencier les mutants de signalisation précoce (blocage de la signalisation AMPc par exemple), qui se traduisent par l'absence de tout développement, des mutants de molécules impliquées plus directement dans le mécanisme de mort vacuolaire. Ainsi, nous récupérons tous les mutants qui présentent un développement, mais avec phénotype anormal des tiges. Nous testons ensuite systématiquement leur phénotype de mort en monocouche. Ces travaux sont actuellement en cours mais d'ores et déjà de récents résultats semblent en faveur de la validité de cette nouvelle approche.

CONCLUSION

Cette nouvelle campagne de mutagenèse suivie de criblage développemental des tiges a pour but d'identifier spécifiquement des molécules nécessaires au mécanisme conduisant à la mort vacuolaire développementale chez *Dictyostelium*. Récemment, l'obtention de mutants potentiels de la mort vacuolaire laisse envisager que cette nouvelle approche pourrait permettre, à terme, de mettre en évidence des molécules clés de la voie moléculaire de MCP chez *Dictyostelium*. L'identification de telles molécules chez *Dictyostelium* permettrait de déterminer s'il existe une conservation phylogénétique de ce mécanisme de mort vacuolaire chez d'autres organismes, et notamment chez l'Homme. Si tel est le cas, une analyse plus approfondie de ces molécules chez l'organisme modèle *Dictyostelium* pourrait permettre de mieux appréhender les mécanismes qui régissent ce type de mort chez l'Homme, et de contribuer aux thérapeutiques visant à augmenter ou à diminuer la mort cellulaire dans des circonstances pathologiques.

Remerciements. – Nous remercions pour leur soutien aux travaux de ce laboratoire l'Association pour la Recherche contre le Cancer, le Ministère de la Recherche et de la Technologie, la Ligue Nationale contre le Cancer et la Commission Européenne (FP6, LSHG-CT-2004-511983).

BIBLIOGRAPHIE

Assuncao Guimaraes C. & Linden R., Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. *Eur. J. Biochem.*, 2004, 271, 1638-1650.

Berks M. & Kay R. R., Combinatorial control of cell differentiation by cAMP and DIF-1 during development of *Dictyostelium discoideum*. *Development*, 1990, 110, 977-984.

Blanton R. L., Fuller D., Iranfar N., Grimson M. J. & Loomis W. F., The cellulose synthase gene of *Dictyostelium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97, 2391-2396.

Bozhkov P. V., Filonova L. H., Suarez M. F., Helmersson A., Smertenko A. P., Zhivotovsky B. & von Arnold S., VEIDase is a principal caspase-like activity involved in plant pro-

grammed cell death and essential for embryonic pattern formation. *Cell Death Differ.*, 2004, 11, 175-182.

Chautan C., Chazal G., Ceconi F., Gruss P. & Golstein P., Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway. *Curr. Biol.*, 1999, 9, 967-970.

Che T., You Y., Wang D., Tanner M. J., Dixit V. M. & Lin X., MALT1/paracaspase is a signaling component downstream of CARMA1 and mediates T cell receptor-induced NF- κ B activation. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, 15870-15876.

Clarke P. G. H., Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat. Embryol.*, 1990, 181, 195-213.

Cornillon S., Foa C., Davoust J., Buonavista N., Gross J. D. & Golstein P., Programmed cell death in *Dictyostelium*. *J. Cell Sci.*, 1994, 107, 2691-2704.

Danial N. N. & Korsmeyer S. J., Cell death: critical control points. *Cell*, 2004, 116, 205-219.

de Chastellier C. & Rytter A., Changes of the cell surface and of the digestive apparatus of *Dictyostelium discoideum* during the starvation period triggering aggregation. *J. Cell Biol.*, 1977, 75, 218-236.

Farach-Carson M. C. & Davis P. J., Steroid hormone interactions with target cells: cross talk between membrane and nuclear pathways. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2003, 307, 839-845.

Fosnaugh K. L. & Loomis W. F., Coordinate regulation of the spore coat genes in *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Genet.*, 1991, 12, 123-132.

Fukuzawa M., Abe T. & Williams J. G., The *Dictyostelium* prestalk cell inducer DIF regulates nuclear accumulation of a STAT protein by controlling its rate of export from the nucleus. *Development*, 2003, 130, 797-804.

Fukuzawa M., Araki T., Adrian I. & Williams J. G., Tyrosine phosphorylation-independent nuclear translocation of a *Dictyostelium* STAT in response to DIF signaling. *Mol. Cell*, 2001, 7, 779-788.

George R. P., Hohl H. R. & Raper K. B., Ultrastructural development of stalk-producing cells in *Dictyostelium discoideum*, a cellular slime mould. *J. Gen. Microbiol.*, 1972, 70, 477-489.

Golstein P., Aubry L. & Levrard J. P., Cell-death alternative model organisms: why and which? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2003, 4, 798-807.

Hengartner M. O., Programmed cell death: a rich harvest. *Curr. Biol.*, 1994, 4, 950-952.

Insall R. & Kay R. R., A specific DIF binding protein in *Dictyostelium*. *EMBO J.*, 1990, 9, 3323-3328.

Insall R., Naylor O. & Kay R. R., DIF-1 induces its own breakdown in *Dictyostelium*. *EMBO J.*, 1992, 11, 2849-2854.

Jermyn K. A., Duffy K. T. & Williams J. G., A new anatomy of the prestalk zone in *Dictyostelium*. *Nature*, 1989, 340, 144-146.

Kanzawa T., Kondo Y., Ito H., Kondo S. & Germano I., Induction of autophagic cell death in malignant glioma cells by arsenic trioxide. *Cancer Res.*, 2003, 63, 2103-2108.

Kay R. R., The biosynthesis of differentiation-inducing factor, a chlorinated signal molecule regulating *Dictyostelium* development. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, 2669-2675.

Kay R. R., Cell differentiation in monolayers and the investigation of slime mold morphogens. *Methods Cell Biol.*, 1987, 28, 433-448.

Kay R. R. & Thompson C. R., Cross-induction of cell types in *Dictyostelium*: evidence that DIF-1 is made by prespore cells. *Development*, 2001, 128, 4959-4966.

Kay R. R., Town C. D. & Gross J. D., Cell differentiation in *Dictyostelium discoideum*. *Differentiation*, 1979, 13, 7-14.

Kerr J. F. R., Wyllie A. H. & Currie A. R., Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 1972, 26, 239-257.

Kitanaka C. & Kuchino Y., Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology. *Cell Death Differ.*, 1999, 6, 508-515.

- Kopachik W., Oohata A., Dhokia B., Brookman J. J. & Kay R. R., *Dictyostelium* mutants lacking DIF, a putative morphogen. *Cell*, 1983, 33, 397-403.
- Kosta A., Roisin-Bouffay C., Luciani M. F., Otto G. P., Kessin R. H. & Golstein P., Autophagy gene disruption reveals a non-vacuolar cell death pathway in *Dictyostelium*. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, 48404-48409.
- Kuspa A. & Loomis W. F., Tagging developmental genes in *Dictyostelium* by restriction enzyme-mediated integration of plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89, 8803-8807.
- Leist M. & Jaattela M., Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2001, 2, 589-598.
- Levraud J. P., Adam M., Luciani M. F., de Chastellier C., Blanton R. L. & Golstein P., *Dictyostelium* cell death: early emergence and demise of highly polarized paddle cells. *J. Cell Biol.*, 2003, 160, 1105-1114.
- Madeo F., Herker E., Maldener C., Wissing S., Lachelt S., Herlan M., Fehr M., Lauber K., Sigrist S. J., Wesselborg S. & Frohlich K. U., A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol. Cell*, 2002, 9, 911-917.
- Morris H. R., Taylor G. W., Masento M. S., Jermyn K. A. & Kay R. R., Chemical structure of the morphogen differentiation inducing factor from *Dictyostelium discoideum*. *Nature*, 1987, 328, 811-814.
- Olie R. A., Durrieu F., Cornillon S., Loughran G., Gross J., Earnshaw W. C. & Golstein P., Apparent caspase independence of programmed cell death in *Dictyostelium*. *Curr. Biol.*, 1998, 8, 955-958.
- Oppenheim R. W., Flavell R. A., Vinsant S., Prevette D., Kuan C. Y. & Rakic P., Programmed cell death of developing mammalian neurons after genetic deletion of caspases. *J. Neurosci.*, 2001, 21, 4752-4760.
- Roisin-Bouffay C., Luciani M. F., Klein G., Levraud J. P., Adam M. & Golstein P., Developmental cell death in *Dictyostelium* does not require paracaspase. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, 11489-11494.
- Ruefli-Brasse A. A., French D. M. & Dixit V. M., Regulation of NF- κ B-dependent lymphocyte activation and development by paracaspase. *Science*, 2003, 302, 1581-1584.
- Ruland J., Duncan G. S., Wakeham A. & Mak T. W., Differential requirement for Malt1 in T and B cell antigen receptor signaling. *Immunity*, 2003, 19, 749-758.
- Schaap P., Nebl T. & Fisher P. R., A slow sustained increase in cytosolic Ca²⁺ levels mediates stalk gene induction by differentiation inducing factor in *Dictyostelium*. *EMBO J.*, 1996, 15, 5177-5183.
- Shimizu S., Kanaseki T., Mizushima N., Mizuta T., Arakawa-Kobayashi S., Thompson C. B. & Tsujimoto Y., Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat. Cell Biol.*, 2004, 6, 1221-1228.
- Shintani T. & Klionsky D. J., Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*, 2004, 306, 990-995.
- Snipas S. J., Wildfang E., Nazif T., Christensen L., Boatright K. M., Bogyo M., Stennicke H. R. & Salvesen G. S., Characteristics of the caspase-like catalytic domain of human paracaspase. *Biol. Chem.*, 2004, 385, 1093-1098.
- Sobolewski A., Neave N. & Weeks G., The induction of stalk cell differentiation in submerged monolayers of *Dictyostelium discoideum*. Characterization of the temporal sequence for the molecular requirement. *Differentiation*, 1983, 25, 93-100.
- Suarez M. F., Filonova L. H., Smertenko A., Savenkov E. I., Clapham D. H., von Arnold S., Zhivotovsky B. & Bozhkov P. V., Metacaspase-dependent programmed cell death is essential for plant embryogenesis. *Curr. Biol.*, 2004, 14, R339-R340.
- Thompson C. R., Fu Q., Buhay C., Kay R. R. & Shaulsky G., A bZIP/bRLZ transcription factor required for DIF signaling in *Dictyostelium*. *Development*, 2004, 131, 513-523.
- Town C. & Stanford E., An oligosaccharide-containing factor that induces cell differentiation in *Dictyostelium discoideum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, 76, 308-312.
- Town C. D., Gross J. D. & Kay R. R., Cell differentiation without morphogenesis in *Dictyostelium discoideum*. *Nature*, 1976, 262, 717-719.
- Uren A. G., O'Rourke K., Aravind L., Pisabarro M. T., Seshagiri S., Koonin E. V. & Dixit V. M., Identification of paracaspases and metacaspases. Two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol. Cell*, 2000, 6, 961-967.
- Vercammen D., Beyaert R., Denecker G., Goossens V., Van Loo G., Declercq W., Grooten J., Fiers W. & Vandenabeele P., Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.*, 1998, 187, 1477-1485.
- Whittingham W. F. & Raper K. B., Non-viability of stalk cells in *Dictyostelium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1960, 46, 642-649.