

## Modifications de la membrane mitochondriale externe au cours de l'apoptose

par Safa Lucken-Ardjomande, Sylvie Montessuit & Jean-Claude Martinou\*

\* Département de biologie cellulaire, Université de Genève, 30, quai Ernest-Ansermet, 1211 Genève 4, Suisse. Tél. : 41 22 379 6443. Fax : 41 22 379 6442. E-mail : Jean-Claude.Martinou@cellbio.unige.ch

Reçu le 23 mai 2005

### RÉSUMÉ

Les mitochondries sont impliquées dans de nombreuses voies de signalisation de l'apoptose. Suite à la perméabilisation de leur membrane externe par des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, elles libèrent plusieurs protéines apoptogènes, dont le cytochrome c, qui contribuent à l'activation des

caspases. Les mécanismes responsables de la perméabilisation membranaire mitochondriale sont encore mal compris. Leur étude a abouti à la construction de plusieurs modèles qui sont analysés dans cette revue.

### SUMMARY Changes in the outer mitochondrial membranes during apoptosis

Mitochondria are involved in many apoptotic responses. Following permeabilization of their outer membrane, they release many apoptogenic proteins, including cytochrome c, which contribute to caspase

activation. The mechanisms responsible for membrane permeability are not completely understood. Here, we briefly review the mechanisms that have been proposed to explain this phenomenon.

L'apoptose est une forme particulière de mort cellulaire, essentielle au développement et à l'homéostasie des organismes multicellulaires. Elle est définie sur la base de critères morphologiques et biochimiques décrits en détail dans la revue de Lockshin page 169 de ce fascicule. Le remodelage de nombreuses membranes cellulaires (membrane cytoplasmique, mitochondriale, lysosomiale) représente un événement majeur du processus apoptotique. En particulier, un changement de perméabilité de la membrane mitochondriale externe aboutit à la libération de facteurs apoptogènes essentiels à l'activation de protéases à cystéine, les caspases (Fischer *et al.*, 2003 ; Nicholson, 1999). Cette revue sera consacrée aux mécanismes responsables des modifications structurales et fonctionnelles de la membrane mitochondriale externe.

### LA MEMBRANE MITOCHONDRIALE EXTERNE

La mitochondrie est constituée de deux membranes: une membrane externe perméable aux ions et aux solutés (< 1 000 daltons) grâce aux canaux VDACs (Voltage Dependent Anion Channel) et une membrane interne, imperméable, formant de nombreux replis appelés crêtes

mitochondriales sur lesquelles sont localisées les protéines de la chaîne respiratoire. Ces deux membranes, bien que séparées par un espace inter-membranaire, s'accrochent par endroits pour former des zones de contact dont la fonction est encore mal comprise.

Au cours de l'apoptose, la membrane mitochondriale externe devient anormalement perméable et permet à de nombreuses protéines de s'échapper de l'espace inter-membranaire (Desagher & Martinou, 2000 ; Kroemer & Reed, 2000). Parmi les centaines de protéines libérées, certaines jouent un rôle primordial dans l'activation des caspases. C'est le cas du cytochrome c qui, une fois dans le cytosol, se lie à la protéine APAF1 en présence de dATP pour former un complexe protéique, l'apoptosome, qui permet le recrutement et l'activation de la caspase 9. La perméabilisation de la membrane externe mitochondriale au cours de l'apoptose est contrôlée par les protéines de la famille Bcl-2.

### LES PROTÉINES DE LA FAMILLE BCL-2 ET LEUR STRUCTURE TRI-DIMENSIONNELLE

La famille Bcl-2 est composée de nombreux membres caractérisés par la présence de domaines d'homologie

logie BH (Bcl-2 Homology domain) (Borner, 2003 ; Cory *et al.*, 2003 ; Willis *et al.*, 2003). On peut classer les membres en trois groupes sur la base de leur fonction anti- ou pro-apoptotique et du nombre (de 1 à 4) de leurs domaines BH (BH1-BH4) : les protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl-1) possédant quatre BH ; les protéines proapoptotiques constituées d'au moins trois domaines BH<sub>2,3,4</sub> (Bax, Bak et Bok/ Mtd) ; les protéines proapoptotiques limitées au seul domaine BH3 (Bid, Bim/Bod, Bad, Bmf, Bik/Nbk, Blk, Noxa, Puma/Bbc3 MAP1 et Hrk/DP5). Dans cette revue, nous appellerons ces dernières « les protéines BH3 ». Par ailleurs, certains membres de la famille Bcl-2 possèdent au niveau de leur extrémité C-terminale une séquence hydrophobe d'une vingtaine d'acides aminés leur permettant de s'ancrer spécifiquement dans certaines membranes intracellulaires (enveloppe nucléaire, membrane du réticulum endoplasmique, membrane externe mitochondriale) (Schinzel *et al.*, 2004). La structure tri-dimensionnelle de Bcl-x, Bcl-2, Bcl-w, KSHV, Bax et Bid révèle une structure globulaire comportant 6 ou 7 hélices  $\alpha$  amphipathiques entourant deux hélices  $\alpha$  hydrophobes centrales (Petros *et al.*, 2004). Cette structure rappelle celle des colicines et du domaine transmembranaire de la toxine diphtérique, deux toxines bactériennes censées former des pores membranaires par l'intermédiaire de leurs deux hélices  $\alpha$  hydrophobes. En outre les protéines Bcl-2, Bcl-x, Bcl-w, KSHV et Bax présentent à leur surface une poche hydrophobe délimitée par les domaines BH1, BH2 et BH3. Le domaine C-terminal hydrophobe de Bax et de Bcl-w est replié dans cette poche hydrophobe (Roucou & Martinou, 2001). De fait, n'ayant pas de domaine hydrophobe exposé à leur surface, Bax et Bcl-w sont solubles dans le cytoplasme. Il est impossible de dire si cette configuration est identique pour Bcl-2 et Bcl-x, ces deux protéines ayant été cristallisées sans leur domaine C-terminal. Cependant la localisation préférentiellement membranaire de ces deux protéines laisse envisager que ce domaine est exposé dès que la protéine a été traduite. Une configuration similaire de ce domaine est probable pour Bak dont la localisation est strictement membranaire. Par conséquent, la poche hydrophobe de Bcl-2, Bcl-x et Bak serait libre d'interagir avec d'autres protéines, en particulier des protéines BH3. Des études de co-cristallographie de Bcl-x et Bcl-2 avec un peptide en hélice  $\alpha$  représentant soit le domaine BH3 de Bak, soit celui de Bad, ont montré que la poche hydrophobe de Bcl-x sert de récepteur pour l'hélice BH3 de Bak ou de Bad.

### UNE DIVERSITÉ DE PROTÉINES BH3

Les protéines BH3 sont soit présentes dans le cytoplasme, libres ou liées au cytosquelette, soit produites *de novo*, à la suite d'un stimulus de mort. Chaque protéine agit dans une voie de signalisation apoptotique spéci-

fique activée par des stimuli de mort extérieurs à la cellule (activation des récepteurs Fas, TNF...) ou provenant de la cellule elle-même (dysfonctionnement d'un organe, agrégat protéique etc...). La multitude des stimuli de mort pourrait expliquer la diversité des protéines BH3 dont le nombre exact n'est probablement pas encore connu. En effet, la séquence en acides aminés du domaine BH3 étant relativement peu conservée (moins de 5 acides aminés consensus), les protéines BH3 dont l'affiliation à la famille Bcl-2 ne repose que sur ce domaine sont difficiles à identifier. Le domaine BH3 est un domaine d'interaction qui permet aux protéines de la famille Bcl-2 de dimériser (ou d'oligomériser). Bien que probablement ressemblants d'un point de vue structural, les domaines de chacun des membres sont suffisamment différents pour conférer à ces protéines des spécificités structurales et fonctionnelles. Par exemple l'affinité de peptides BH3 dérivés de Bad ou de Bak pour Bcl-2 est 10 fois supérieure à l'affinité de ces peptides pour Bcl-x[9]. Une mutation d'un acide aminé du domaine BH3 de Bcl-2 est suffisante pour rendre Bcl-2 pro-apoptotique. Enfin, les protéines BH3 ont pu être classées en deux catégories sur la base de leur interaction avec Bcl-2, Bcl-X ou Bax : celles qui comme Bad et BimES interagissent spécifiquement avec Bcl-2 ou Bcl-X et inhibent ainsi leur activité antiapoptotique et celles qui comme tBid et Bims peuvent interagir avec Bax ou Bak et les activent (Terradillos *et al.*, 2002 ; Letai *et al.*, 2002).

### ACTIVATION DE Bax ET DE Bak

Dans une cellule saine, Bax est cytosolique, soit libre et monomérique, soit complexé avec des protéines comme 14.3.3 (Nomura *et al.*, 2003), Humanin (Guo *et al.*, 2003), Ku70 (Sawada *et al.*, 2003) ou la protéine ARC (Apoptosis Repressor with Caspase recruitment domain) (Nam *et al.*, 2004). Bak est ancré dans la membrane mitochondriale externe où il pourrait interagir avec VDAC2 (de faibles quantités de Bak ont également été détectées dans la membrane du réticulum endoplasmique) (Cheng *et al.*, 2003). Au cours de l'apoptose induite par de nombreux stimuli, il est probable que, à la suite d'un changement de conformation, le domaine C-terminal de Bax est délogé de la poche hydrophobe et permet ainsi la localisation de la protéine au niveau mitochondrial. Un changement d'isomérisation au niveau de la proline 168 pourrait être nécessaire pour rompre les interactions intramoléculaires qui maintiennent Bax à l'état soluble dans le cytoplasme (Schinzel *et al.*, 2004). Par ailleurs, les protéines BH3 telles tBid ou Bims, en se fixant dans la poche hydrophobe de Bax ou de Bak, induiraient un deuxième changement conformationnel aboutissant à l'exposition du domaine N-terminal de ces protéines. Au niveau de la membrane mitochondriale externe, Bax et Bak semblent concentrées au niveau des sites de contact où la présence de cardiolipine participerait à leur oligomérisation (Kuwana *et al.*, 2002 ; Ardail

*et al.*, 1990; Hovius *et al.*, 1993). Ces deux protéines seraient alors ancrées dans la membrane par l'intermédiaire de leurs hélices hydrophobes  $\alpha 5$  et  $\alpha 6$  (modèle basé sur l'analogie de structure avec les toxines bactériennes décrites plus haut).

## LA MEMBRANE EXTERNE DE LA MITOCHONDRIE DEVIENT PERMÉABLE AUX PROTÉINES

Plusieurs modèles ont été proposés pour rendre compte du mécanisme par lequel Bax et Bak rendent la membrane externe de la mitochondrie perméable aux protéines apoptogènes (Desagher & Martinou, 2000). Un modèle prédit l'ouverture du pore de transition de perméabilité (PTP), un pore dont les composants majeurs seraient VDAC sur la membrane mitochondriale externe et ANT (Adenine Nucleotide Translocator) au niveau de la membrane interne. Au cours de l'apoptose, Bax, en interagissant avec ANT, provoquerait l'ouverture du PTP ce qui entraînerait ainsi une entrée d'eau dans la matrice, un gonflement de la mitochondrie, la rupture de la membrane externe mitochondriale et la diffusion passive de nombreuses protéines de l'espace intermembranaire dans le cytosol. Des expériences récentes ont montré que dans des cellules déficientes en ANT ou en cyclophiline D, un important régulateur du PTP, la perméabilisation de la membrane mitochondriale et l'apoptose se déroulent normalement. Ces résultats ont passablement ébranlé le modèle associant Bax au PTP (Kokoszka *et al.*, 2004; Nakagawa *et al.*, 2005; Baines *et al.*, 2005). D'autres hypothèses postulent que Bax pourrait former, seul ou en association avec VDAC, un pore membranaire suffisamment large pour laisser passer des protéines de gros calibre. Toutefois, l'implication de VDAC dans l'apoptose demeure très controversée car, selon certains auteurs, VDAC serait fermé plutôt qu'ouvert durant l'apoptose. Enfin, plusieurs travaux suggèrent la possibilité que Bax puisse former des pores résultant d'une déstabilisation des lipides membranaires (Lucken-Ardjomande *et al.*, 2005). Ces travaux montrent que la capacité de Bax à perméabiliser des membranes artificielles (liposomes, bicouches lipidiques planes) dépend étroitement de la composition lipidique de ces membranes. Selon Basanez et collaborateurs (Basanez *et al.*, 2001, 2002), les lipides qui confèrent une courbure positive aux membranes, tels les lysophospholipides (phosphatidyl-choline, phosphatidyl-éthanolamine), favoriseraient l'effet perméabilisant de Bax tandis que les lipides qui confèrent une courbure négative, tels le dioléoyl-glycérol ou le dioléoyl-phosphatidyl-éthanolamine, auraient un effet inverse sur Bax. A l'inverse, Epand et collaborateurs ont rapporté que ce sont les lipides à courbure négative qui favorisent l'effet de Bid en créant des phases hexagonales particulièrement instables et perméables (Epand *et al.*, 2002). Même si le rôle des lipides dans la perméabilité membranaire est encore loin d'être clair, leur étude représente un champ d'investigation nouveau et prometteur.

## CONCLUSION

Les protéines de la famille Bcl-2 ont été identifiées de longue date mais leur mécanisme d'action est toujours mal compris. Le mécanisme par lequel ces protéines régulent la perméabilité de la membrane mitochondriale externe est encore énigmatique. La réponse à cette question proviendra probablement d'approches multidirectionnelles, en particulier de celles combinant biochimie et biophysique des membranes.

## BIBLIOGRAPHIE

- Ardaill D. *et al.*, Mitochondrial contact sites. Lipid composition and dynamics. *J. Biol. Chem.*, 1990, 265, 18797-18802.
- Baines C. P., K. R., Purcell N. H., Blair N. S., Osinska H., Hambleton M. A., Brunskill E. W., Sayen M. R., Gottlieb R. A., Dorn G. W., Robbins J. & Molkenin J. D., Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature*, 2005, 434, 658-662.
- Basanez G. *et al.*, Pro-apoptotic cleavage products of Bcl-xL form cytochrome c-conducting pores in pure lipid membranes. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 31083-31091.
- Basanez G. *et al.*, Bax-type apoptotic proteins porate pure lipid bilayers through a mechanism sensitive to intrinsic monolayer curvature. *J. Biol. Chem.*, 2002, 14, 14.
- Borner C., The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol. Immunol.*, 2003, 39, 615-647.
- Cheng E. H. *et al.*, VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science*, 2003, 301, 513-517.
- Cory S., Huang D. C. & Adams J. M., The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*, 2003, 22, 8590-8607.
- Desagher S. & Martinou J. C., Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.*, 2000, 10, 369-377.
- Epand R. F. *et al.*, The apoptotic protein tBid promotes leakage by altering membrane curvature. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, 32632-32639.
- Fischer U., Janicke R. U. & Schulze-Osthoff K., Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ.*, 2003, 10, 76-100.
- Guo B. *et al.*, Humanin peptide suppresses apoptosis by interfering with Bax activation. *Nature*, 2003, 423, 456-461.
- Hovius R. *et al.*, Phospholipid asymmetry of the outer membrane of rat liver mitochondria. Evidence for the presence of cardiolipin on the outside of the outer membrane. *FEBS Lett.*, 1993, 330, 71-76.
- Kokoszka J. E. *et al.*, The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature*, 2004, 427, 461-465.
- Kroemer G. & Reed J. C., Mitochondrial control of cell death. *Nat. Med.*, 2000, 6, 513-9.
- Kuwana T. *et al.*, Bid, Bax, and lipids cooperate to form supra-molecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell*, 2002, 111, 331-342.
- Letai A. *et al.*, Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell*, 2002, 2, 183.
- Lucken-Ardjomande, S. a. M., J.-C., Newcomers in the process of mitochondrial permeabilization. *J. Cell Sci.*, 2005, 118, 473-483.
- Nakagawa T., S. S., Watanabe T., Yamaguchi O., Otsu K., Yamagata H., Inohara H., Kubo T. & Tsujimoto Y., Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature*, 2005, 434, 652-658.
- Nam Y. J. *et al.*, Inhibition of both the extrinsic and intrinsic death

- pathways through nonhomotypic death-fold interactions. *Mol. Cell*, 2004, 15, 901-912.
- Nicholson D. W., Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.*, 1999, 6, 1028-1042.
- Nomura M. *et al.*, 14-3-3 Interacts directly with and negatively regulates pro-apoptotic Bax. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278, 2058-2065.
- Petros A. M., Olejniczak E. T. & Fesik S. W., Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 2004, 1644, 83-94.
- Roucou X. & Martinou J. C., Conformational change of Bax: a question of life or death. *Cell Death Differ.*, 2001, 8, 875-877.
- Sawada M. *et al.*, Ku70 suppresses the apoptotic translocation of Bax to mitochondria. *Nat. Cell Biol.*, 2003, 5, 320-329.
- Schinzl A. *et al.*, Conformational control of Bax localization and apoptotic activity by Pro168. *J. Cell Biol.*, 2004, 164, 1021-1032.
- Terradillos O. *et al.*, Direct addition of BimL to mitochondria does not lead to cytochrome c release. *FEBS Lett.*, 2002, 522, 29-34.
- Willis S. *et al.*, The Bcl-2-regulated apoptotic pathway. *J. Cell Sci.*, 2003, 116, 4053-4056.
-