

MARIO OUELLET

**Analyse fonctionnelle d'homologues végétaux de Bax
Inhibitor-1 et développement d'un modèle de mort
cellulaire programmée induite par Bax chez des cultures
cellulaires de *Nicotiana tabacum***

Mémoire
présenté à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en biochimie
pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES ET DE GÉNIE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

JUIN 2004

Résumé

La mort cellulaire programmée est un phénomène essentiel retrouvé chez pratiquement toutes les formes de vie. Chez les mammifères, l'apoptose est une forme de mort importante et très étudiée qui a beaucoup influencé l'étude de la mort cellulaire programmée chez les végétaux. Si la plupart des régulateurs et des effecteurs de l'apoptose animale ne sont pas retrouvés chez les plantes, la similarité de certaines caractéristiques morphologiques et biochimiques laisse croire que certains sentiers de régulation sont évolutivement conservés entre ces deux règnes. Dans ce travail, nous démontrons que les homologues végétaux de BI-1, l'un des rares régulateurs de l'apoptose retrouvé chez les plantes, sont très bien conservés structurellement; certaines caractéristiques déduites des BI-1 végétaux permettent de supposer un mode d'action dans la régulation de la mort. Aussi, nous montrons que les homologues végétaux de BI-1 inhibent l'apoptose induite par la surexpression de Bax chez les cellules humaines 293. Le développement et la caractérisation d'un modèle de mort cellulaire induite par Bax chez les végétaux ont aussi été entrepris. Dans un premier temps, l'expression transitoire de Bax murin par infiltration d'*Agrobacterium* dans des feuilles de tabac n'a pas causé de phénotype de mort. Par contre, des lignées stables de cellules de tabac BY-2 exprimant constitutivement Bax, seul ou en fusion avec les rapporteurs GFP ou GUS, présentent une mort cellulaire prématurée. La mort de ces cellules est accompagnée d'un changement de l'aspect des cultures, de la fragmentation de l'ADN génomique et de modifications morphologiques caractéristiques des cellules végétales en PCD. Ces lignées ont aussi une sensibilité accrue à la mort causée par un milieu de culture sans sucrose. L'ensemble de ces données, remis dans un contexte plus large, renforce l'idée de l'existence une forme de mort évolutivement ancienne à l'origine de toutes les formes de PCD retrouvées aujourd'hui.

Table des matières

Résumé.....	II
Table des matières	III
Liste des tableaux et figures.....	VI
Liste des abréviations.....	VII
Chapitre 1 Introduction.....	2
1.1 Mort cellulaire programmée, apoptose, nécrose ?	2
1.1.1 Origine des concepts fondamentaux	2
1.1.2 Usage des termes	4
1.2 L'apoptose	5
1.2.1 Caspases et démolition cellulaire.....	5
1.2.1.1 Structure et spécificité	6
1.2.1.2 Activité et substrats.....	8
1.2.1.3 Modes d'activation	9
1.2.2 Régulation I : récepteurs de mort (et de survie ?).....	12
1.2.2.1 La mort en Fas	12
1.2.2.2 Les TNFR : question de vie ou de mort.....	13
1.2.3 Régulation II : la famille de Bcl-2 et la mitochondrie	17
1.2.3.1 Les protéines : relation structure-fonction	18
1.2.3.2 Régulation transcriptionnelle et post-traductionnelle	24
1.2.3.3 Faire la peau aux mito.....	27
1.2.3.4 Y a-t-il quelque chose avant la mitochondrie ? Le rôle du RE.....	32
1.2.4 Mourir sans caspase ? La mort indigne et l'évolution des mœurs.....	37
1.3 La PCD chez les végétaux	41
1.3.1 Paradigmes de PCD chez les plantes : un mode de vie	42
1.3.1.1 Développement et PCD	43
1.3.1.2 Adaptation à l'environnement et résistance aux pathogènes	46
1.3.2 Effecteurs de la mort.....	51
1.3.2.1 Activité caspase et les métacaspases	51
1.3.2.2 Autres protéases.....	52
1.3.2.3 Nucléases	54
1.3.3 Signalisation, régulation et régulateurs.....	55
1.3.3.1 Signaux et sentiers de mort.....	55
1.3.3.2 Régulateurs	60
1.4 Hypothèse et buts du projet	62
Chapitre 2 Méthodologie	64
2.1 Analyses informatiques.....	64
2.1.1 Séquences.....	64

2.1.2	Alignement de séquences.....	64
2.1.3	Analyse phylogénétique.....	64
2.1.4	Recherche de signaux de localisation intra-cellulaire.....	65
2.1.5	Prédiction des domaines transmembranaires et de leur topologie.....	65
2.2	Matériel biologique.....	65
2.2.1	Cellules humaines.....	65
2.2.2	Plantes.....	66
2.2.3	Cellules végétales.....	66
2.2.4	Bactéries.....	66
2.3	Plasmides et constructions.....	67
2.3.1	Sources du matériel.....	67
2.3.2	Méthodes générales.....	67
2.3.2.1	Préparation d'ADN plasmidique.....	67
2.3.2.2	Amplification PCR.....	67
2.3.2.3	Digestions.....	68
2.3.2.4	Purification et dosage sur gel d'agarose.....	68
2.3.2.5	Ligature et électroporation.....	68
2.3.2.6	Sélection d'un clone par analyse de restriction.....	68
2.3.2.7	Transformation d' <i>Agrobacterium</i>	69
2.3.3	Constructions.....	69
2.4	Essai fonctionnel chez les cellules animales.....	70
2.5	Expression transitoire <i>in planta</i>	71
2.6	Transformation stable de cellules BY-2.....	72
2.7	Analyses de type Northern et Southern.....	72
2.8	Analyse de type Western.....	73
2.8.1	Extraction des protéines et dosage.....	73
2.8.2	Électrophorèse et immunodétection.....	74
2.9	Détection et quantification de l'activité β -glucuronidase.....	74
2.10	Évaluation de la croissance des cultures cellulaires.....	75
2.11	Quantification de la mort cellulaire.....	75
2.11.1	Méthode microscopique.....	75
2.11.2	Méthode spectrophotométrique.....	75
2.12	Test TUNEL sur des cellules végétales en culture.....	76
2.13	Microscopie.....	76
Chapitre 3	Résultats.....	78
3.1	Analyse structurelle et fonctionnelle d'homologues végétaux de BI-1.....	78
3.1.1	Analyse informatique.....	78
3.1.1.1	Comparaison de séquences.....	78
3.1.1.2	Prédiction de la localisation intracellulaire.....	80

3.1.1.3	Détection des domaines transmembranaires et prédiction de la topologie...	80
3.1.2	Essai fonctionnel de BnBI-1 et NtBI-1 dans le système animal.....	82
3.2	Caractérisation de la PCD déclenchée par Bax chez les végétaux	83
3.2.1	Expression transitoire de Bax <i>in planta</i>	83
3.2.2	Lignées cellulaires exprimant Bax.....	85
3.2.2.1	Vérification de la transformation.....	86
3.2.2.2	Vérification de l'expression.....	87
3.2.2.3	Cinétique de croissance	90
3.2.2.4	Phénotype macroscopique	91
3.2.2.5	Quantification de la mort cellulaire	93
3.2.2.6	Morphologie cellulaire.....	95
3.2.2.7	Fragmentation de l'ADN nucléaire.....	95
3.2.2.8	Mortalité dans du milieu sans sucrose	98
3.2.2.9	Lignées inductibles	99
Chapitre 4	Discussion	100
4.1	Les homologues végétaux de BI-1 sont très bien conservés structurellement et fonctionnellement	100
4.2	Bax déclenche prématurément la PCD chez des cellules en culture	102
	Conclusion	105
	Références.....	107

Liste des tableaux et figures

Tableaux

Tableau 1 Constructions utilisées pour la transformation	70
--	----

Figures

Figure 1 Structure des caspases.	7
Figure 2 Modes d'activation des caspases.	10
Figure 3 Régulation de l'apoptose par les récepteurs de mort.	13
Figure 4 Activation de NF- κ B et son action anti-apoptotique.	15
Figure 5 Classification des membres de la famille de Bcl-2.	20
Figure 6 Structure des membres de la famille de Bcl-2.	22
Figure 7 Mécanismes de perméabilisation de la membrane mitochondriale externe par les pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2.	28
Figure 8 Les rôles du Ca ²⁺ et de Bax.	36
Figure 9 La PCD dans la vie des angiospermes.	44
Figure 10 Adaptation à l'environnement et PCD.	49
Figure 11 Structure et localisation des principales familles des produits des gènes R.	57
Figure 12 Comparaison des séquences protéiques déduites d'homologues végétaux et animaux de BI-1.	79
Figure 13 Schéma récapitulatif de certaines caractéristiques structurales déduites des homologues végétaux de BI-1 au sein des membranes des organelles.	81
Figure 14 Inhibition de l'apoptose induite par Bax chez les cellules humaines 293 par BnBI-1 et NtBI-1.	83
Figure 15 Expression transitoire de Bax dans des feuilles de tabac <i>via</i> infiltration d' <i>Agrobacterium</i>	84
Figure 16 Analyse Southern des lignées transformées avec Bax ou Bax/Gus.	87
Figure 17 Caractérisation de l'expression de Bax chez les lignées transformées.	89
Figure 18 Cinétique de croissance des lignées transgéniques.	91
Figure 19 Localisation de la fusion sGFP/Bax chez les cellules BY-2.	92
Figure 20 Aspect des cultures transgéniques 13 jours suivant le repiquage.	92
Figure 21 Évaluation du taux de mortalité chez les lignées transformées.	94
Figure 22 Morphologie cellulaire chez les cultures âgées.	96
Figure 23 Fragmentation de l'ADN nucléaire chez les lignées exprimant Bax ou la fusion Bax/Gus.	97
Figure 24 Suivi du taux de mortalité des lignées exprimant Bax seul ou en fusion dans du milieu dépourvu de sucrose.	98

Liste des abréviations

$\Delta\Psi_m$: différence de potentiel de la membrane mitochondriale

a.a. : acide aminé

ADNc : ADN complémentaire

ADNg : ADN génomique

AIF : *apoptosis-inducing factor*

ANT : *adenine nucleotide transporter*

ATP : adénosine triphosphate

Bax : *Bcl-2-associated protein X*

Bcl-2 : *b-cell lymphoma-2*

BH : *Bcl-2 homology*

BI-1 : *Bax inhibitor-1*

BSA : *bovine seric albumin*

CAD : *caspase-activated DNase*

CARD : *caspase recruitment domain*

CDK : *cyclin-dependent kinase*

CED : *cell death*

CTAB : *Hexadecyltrimethylammonium bromide*

D.O. λ : densité optique à la longueur d'onde λ

DABCO : *1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane*

DAPI : *4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride*

DD : *death domain*

DED : *death effector domain*

EDTA : *ethylene diamine tetraacetic acid*

EST : *expressed sequence tags*

FADD : *Fas-associated death domain*

FBS : *fœtal bovine serum*

Gus : β -glucuronidase

HBS : *HEPES-buffered saline*

IAP : *Inhibitors of apoptosis*

IMDM : *Iscove's modified Dulbecco's medium*

MS : *Murashige & Skoog*

MU : *4-Methylumbelliferone*
MUG : *4-methylumbelliferyl β -D-glucuronide*
NF- κ B : *nuclear factor κ B*
pb: *paire de base*
PBS : *phosphate buffered saline*
PCD : *programmed cell death*
PCR : *polymerase chain reaction*
PCV : *packed cell volume*
PI : *iodure de propidium*
PMSF : *phenylmethyl sulfonide fluoride*
PTP : *permeability transition pore*
PVDF : *polyvinylidene difluoride*
RE : *réticulum endoplasmique*
RIP : *receptor interactive protein*
ROS : *reactive oxygen species*
SDS : *sodium dodecyl sulfate*
sGFP : *synthetic green fluorescent protein*
SSC : *sodium salt citrate*
TE : *tracheary element*
TM : *domaine transmembranaire*
TMhp : *domaine transmembranaire hautement probable*
TMp : *domaine transmembranaire probable*
TMV : *tobacco mosaic virus*
TNF-R : *tumor necrosis factor (receptor)*
TRADD : *TNF receptor associated death domain*
TRAF-2 : *TNF receptor associated factor-2*
TUNEL : *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling*
U : *unité d'activité enzymatique*
U.V. : *ultraviolet*
VDAC : *voltage-dependent anion channel*
X-Gluc : *5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide*

"Si le chercheur allait à son travail sans aucune opinion préconçue, comment serait-il capable de choisir ces faits, parmi l'immense abondance de l'expérience la plus complexe, et seulement ces faits qui sont assez simples pour permettre que les connections aux règles soit évidentes ?"

Albert Einstein

"La nouveauté n'émerge qu'avec difficulté, manifestée par la résistance, contre un cadre fourni par les attentes"

"La découverte commence avec la conscience de l'anomalie, c'est-à-dire la reconnaissance que la nature a, d'une manière ou d'une autre, violé les attentes provoquées par les paradigmes qui gouvernent la science normale"

Thomas S. Kuhn

"To live is to die"

Metallica

Chapitre 1 Introduction

1.1 Mort cellulaire programmée, apoptose, nécrose ?

1.1.1 Origine des concepts fondamentaux

Le concept que la mort de certains tissus puisse être normale remonte à la renaissance, avec l'observation de la métamorphose des insectes et des amphibiens. Mais la reconnaissance que la mort est un phénomène biologique important n'est venue que beaucoup plus tard avec l'essor du microscope et de la théorie cellulaire. À la fin du XIX^e et au début du XX^e siècles, plusieurs études de biologie du développement et de phytopathologie (citées dans Bursch *et al.*, 2000; Jones, 2001; Zakeri et Lockshin, 2002) ont contribué à l'idée d'une mort cellulaire physiologique et active.

Dans les années 1960, il devient clair que la mort cellulaire est un processus essentiel à la vie. Dans un article avant-gardiste, Léopold (1961) a décrit les avantages évolutifs conférés par la sénescence chez les plantes, sa fonction dans plusieurs processus physiologiques, son contrôle par des signaux de survie ou de mort et sa régulation hormonale. Plusieurs études ont décrit des modifications ultrastructurales chez les cellules végétales en sénescence dans la décennie suivante. Parallèlement, Lockshin et Williams (1965a; 1965b; 1965c), en étudiant la métamorphose des papillons, ont introduit l'expression « mort cellulaire programmée » (PCD, *programmed cell death*) et ont reconnu l'implication d'hormones dans la régulation du processus et d'enzymes cataboliques dans le démantèlement de la cellule. C'est l'observation que les mêmes modifications morphologiques surviennent lors de la mort de plusieurs types cellulaires, au cours du développement normal ou de pathologies, qui mène Kerr et collaborateurs (1972), « dans l'ignorance des travaux précédents », à proposer la classification de la mort cellulaire en deux catégories : apoptotique ou nécrotique (voir la rétrospective de Kerr, 2002).

Le terme « apoptose », dérivé d'un mot grec décrivant la chute des feuilles mortes d'un arbre en automne, est utilisé pour désigner un type de mort « intrinsèquement programmée », qui « semble jouer un rôle opposé mais complémentaire à la mitose dans la régulation des populations cellulaires animales » et qui « peut être initiée ou inhibée par

une variété de stimuli environnementaux, physiologiques ou pathologiques ». Ce type de mort est alors défini par des modifications morphologiques caractéristiques - condensation du cytoplasme; détachement des autres cellules dans les tissus; condensation de la chromatine en périphérie du noyau; fragmentation de la cellule en « corps apoptotiques » délimités par une membrane sans qu'il y ait fuite du contenu cellulaire, suivies d'une phagocytose et d'une dégradation rapide des corps apoptotiques par les cellules voisines. Par opposition, le mot « nécrose », qui référait jusqu'alors à tout type de mort, a été restreint à une mort cellulaire accidentelle causée par des perturbations environnementales « qui doivent être violentes et mener à une interruption rapide des fonctions majeures et à l'effondrement de l'homéostasie interne » (Kerr *et al.*, 1972). Peu après, les premiers marqueurs biochimiques de l'apoptose ont été reconnus, soit l'activation d'endonucléases (Williams *et al.*, 1974) et la digestion de l'ADN génomique (ADNg) en fragments de longueurs spécifiques formant des « échelles » (Wyllie, 1980). Mais l'acceptation générale de l'idée d'un programme de mort, essentiellement programmé dans les gènes, n'est vraiment venue que beaucoup plus tard.

C'est grâce aux découvertes des processus génétiques et biochimiques régulant la PCD que cette notion a progressé rapidement. Au début des années 1980, les travaux pionniers de Horvitz et collaborateurs (Hedgecock *et al.*, 1983) avec le nématode *Caenorhabditis elegans*, chez lequel exactement 131 des 1090 cellules somatiques meurent lors du développement normal, ont conduit à l'identification de toute une gamme de gènes spécifiques à la PCD. Parmi ceux-ci, notons *ced-3* et *ced-4* (*ced* pour *cell death*), dont les fonctions sont requises pour l'initiation de la PCD lors du développement du ver (Ellis et Horvitz, 1986); mais ce n'est que beaucoup plus tard que le premier gène *ced* a été cloné et séquencé (Yuan et Horvitz, 1992). Chez l'humain, le gène *bcl-2* (pour *b-cell lymphoma*), initialement identifié (Cleary *et al.*, 1986) lors d'une translocation souvent associée à une des formes de cancer des cellules sanguines les plus courantes, a été le premier régulateur dont la fonction dans l'apoptose a été éclaircie. La surexpression de *bcl-2*, contrairement à d'autres oncogènes connus à l'époque (*c-myc* par exemple), ne stimule pas la prolifération cellulaire, mais exerce plutôt son action en empêchant la PCD causée par le retrait du facteur de croissance (Vaux *et al.*, 1988). L'idée que des cancers pouvaient être causés par une absence d'apoptose a ouvert la voie à la frénésie actuelle de la recherche dans ce

domaine. Dans les années qui ont suivi, l'apoptose s'est révélée être une composante importante dans des maladies auto-immunes et le développement général du système immunitaire (Strasser *et al.*, 1991), puis dans le SIDA et dans des maladies dégénératives du système nerveux, comme le Parkinson et l'Alzheimer (revue par Duke *et al.*, 1996). Depuis, la croissance du domaine de recherche a été exponentielle; d'une dizaine d'articles consacrés à la PCD par année jusqu'à la fin des années 1980, le nombre de publications référant au terme « apoptose » dépasse maintenant 200 par semaine (Vaux, 2002). La recherche sur la PCD végétale a suivi, avec une véritable explosion au milieu des années 1990.

1.1.2 Usage des termes

Pour certains auteurs, il n'y a pas de différence entre mort cellulaire programmée et apoptose et ces termes sont utilisés sans distinction. Ceci est probablement dû au fait que, chez les cellules animales, les cas les plus étudiés présentent des caractéristiques classiques de l'apoptose et à la découverte que la surexpression de l'anti-apoptotique humain *bcl-2* inhibe la PCD chez *C. elegans* (Vaux *et al.*, 1992), suggérant qu'il s'agissait d'un même phénomène, évolutivement conservé entre les invertébrés et les mammifères. La classification de la mort en nécrose ou apoptose semblait alors évidente. Si bien que l'idée (erronée) que toute mort non apoptotique soit nécrotique était courante dans plusieurs milieux. Par contre, il est maintenant clair, particulièrement chez les végétaux, que certaines formes de mort cellulaire n'exhibent pas nécessairement les caractéristiques décrites pour l'apoptose des cellules animales (voir par exemple la revue de Bursch *et al.*, 2000). Ainsi, plusieurs auteurs emploient « mort cellulaire programmée » comme terme général pour désigner le concept fonctionnel impliquant tout processus de mort cellulaire actif et limitent « apoptose » à une forme particulière de PCD qui passe par des modifications morphologiques et biochimiques précises. À l'opposé de la PCD, la nécrose est définie comme une mort incontrôlée, violente et rapide, causée par une insulte physique ou chimique extrême et se manifeste souvent comme un éclatement immédiat de la cellule et des organelles. Ces dernières interprétations seront privilégiées dans cet ouvrage.

1.2 L'apoptose

Étant donné l'attention considérable portée à l'apoptose animale dans les années 1990, plusieurs stéréotypes ayant émergé de ces travaux ont influencé la recherche chez les autres organismes, dont les végétaux. De la même manière, cette section présente une vue d'ensemble des connaissances sur l'apoptose qui servira de point de comparaison.

Au cours de la vie de tout animal, des cellules sont continuellement renouvelées par des divisions et d'autres meurent par apoptose; dans les deux cas, le bon fonctionnement du processus repose sur le contrôle exercé par un réseau moléculaire sophistiqué. Les cellules peuvent mourir parce qu'elles sont trop abîmées, fonctionnent mal ou qu'elles ne sont plus utiles à l'organisme. La machinerie apoptotique pourvoit efficacement au démantèlement de la cellule à partir de l'intérieur au moment adéquat. Un groupe d'enzymes protéolytiques, les caspases, occupe un rôle majeur dans cette démolition contrôlée. Plusieurs signaux de survie et de mort, intra et extracellulaires, sont constamment perçus et intégrés pour contrôler l'activité des caspases et ainsi déterminer le sort de la cellule. Deux voies classiques ont été décrites pour assurer cette régulation de la vie et de la mort : le sentier des récepteurs de mort et le sentier mitochondrial.

1.2.1 Caspases et démolition cellulaire

Les caspases ont d'abord été impliquées dans l'apoptose grâce aux travaux chez *C. elegans*. Yuan et collaborateurs (1993) ont découvert que la protéine codée par le gène *ced-3*, essentielle à la PCD chez le ver, est similaire à une protéase humaine appelée ICE (*interleukin-1 β -converting enzyme*). Cette observation a été la première preuve de la nécessité de la protéolyse pour l'exécution du programme de mort. Peu après, toute une série de membres de la nouvelle famille CED-3/ICE (ou *ICE-like proteases*) a été découverte, souvent par homologie de séquence. Ces protéases ont été renommées caspases puisqu'elles ont toutes un résidu cystéine dans leur site actif et qu'elles clivent leur cible après un résidu aspartate (une spécificité très rare chez les autres classes de protéases) (Alnemri *et al.*, 1996). Plus d'une douzaine de caspases ont été trouvées chez l'humain, et regroupées selon leur fonction : celles ayant un rôle dans l'apoptose (comme les caspase-2, -3, -6, -7, -8, -9 et -10) et celles impliquées dans la maturation de cytokines pro-inflammatoires dans la réponse immunitaire (ICE ou caspase-1, -4 et -5). Les caspases

impliquées dans l'apoptose peuvent encore être subdivisées en caspases initiatrices (caspase-2, -8, -9 et -10), responsables du déclenchement des cascades d'activation des caspases et en caspases effectrices (caspase-3, -6 et -7) qui dégradent des substrats cellulaires spécifiques. Cependant, il est à noter que très peu de données sont disponibles sur les fonctions de plusieurs caspases (comme les caspase-2, -4, -5, -7 et -13) et que leurs rôles demeurent encore controversés. De nombreuses revues ont été publiées sur les caspases; le lecteur est dirigé vers Thornberry et Lazebnik, 1998; Earnshaw *et al.*, 1999; Chang et Yang, 2000; Creagh et Martin, 2001.

1.2.1.1 Structure et spécificité

Les caspases sont bien conservées évolutivement, de l'humain jusqu'aux nématodes et aux insectes. Elles sont toutes produites sous forme d'un grand précurseur inactif (procaspase; 30-50 kDa) contenant trois domaines : un pro-domaine en N-terminal, une grosse sous-unité (~ 20 kDa, p20), et une petite sous-unité (~ 10 kDa, p10) (figure 1A). Les caspases initiatrices ont généralement un pro-domaine plus long, moins conservé, où on peut retrouver deux motifs apparentés. Le DED (*death effector domain*), présent dans les caspase-8 et -10, interagit avec les DED de protéines impliquées dans la signalisation, comme FADD (*Fas-associated death domain*) (Boldin *et al.*, 1995). Le CARD (*caspase recruitment domain*) (Hofmann *et al.*, 1997), dans les caspase-1, -2, -4 et -9, est important dans les interactions avec d'autres caspases ou toute une gamme de protéines adaptatrices et régulatrices.

L'activation d'une procaspase dépend d'une part du clivage après des résidus aspartate, ce qui suggère l'autocatalyse (voir section 1.2.1.3) et de l'association subséquente des deux sous-unités pour former un hétérodimère p10-p20 avec un site actif auquel contribuent des acides aminés de chaque chaîne. Les structures cristallines des caspase-1, -3, -7 et -8 ont été déterminées (Wilson *et al.*, 1994; Rotonda *et al.*, 1996; Blanchard *et al.*, 1999; Watt *et al.*, 1999; Wei *et al.*, 2000) et la structure de la caspase-9 a été prédite sur cette base (Chou *et al.*, 2000).

La ressemblance de ces structures et d'autres données suggèrent que les caspases actives sont sous une forme tétramérique (deux hétérodimères p10-p20), générant ainsi deux sites actifs indépendants (voir Earnshaw *et al.*, 1999; Grütter, 2000) (figure 1B-C). D'un autre

côté, sur une base structurale, il semble plausible que des dimères p10-p20 actifs puissent aussi être retrouvés dans certaines conditions.

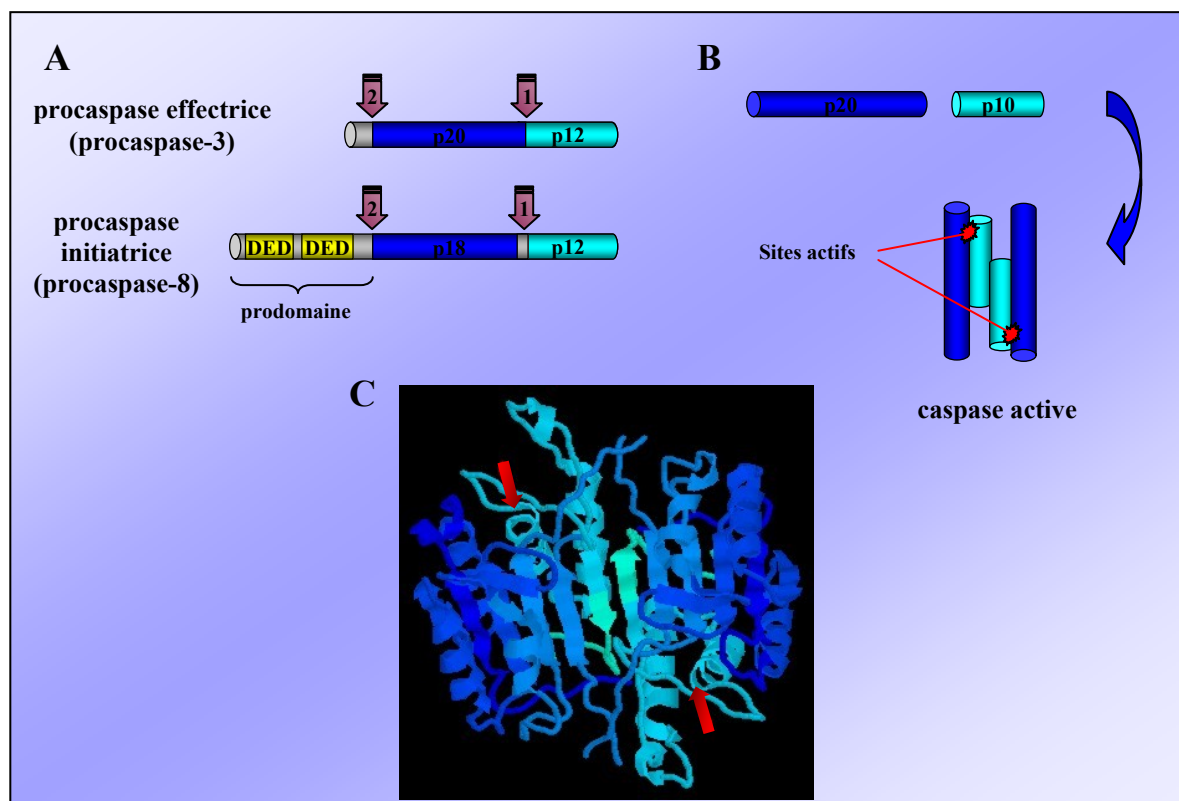


Figure 1 Structure des caspases. (A) Les caspases sont produites sous forme de précurseurs inactifs contenant un prodomaine et deux sous-unités d'environ 20 et 10 kDa (p20 et p10, respectivement ou p18 et p12 dans les exemples montrés). Le prodomaine des caspases initiatrices est plus long et contient des domaines (comme le DED) importants pour l'interaction avec des protéines adaptatrices. Les flèches montrent l'ordre de clivage des procaspases. (B) Après clivage, les sous-unités s'associent pour former la structure active comportant deux sites actifs. (C) Structure tridimensionnelle de la caspase-3 complexée avec des tetrapeptides (flèches) aux sites actifs. Les sous-unités p20 (bleu foncé) et p10 (bleu pâle) participent à la formation des sites actifs. (La représentation de la structure a été préparée avec Chimie 2.6 à partir des coordonnées disponibles dans Protein Data Bank).

Les différences structurelles les plus marquées se retrouvent autour des sites actifs et sont responsables des différences de spécificité entre les caspases. Toutes clivent uniquement après un résidu Asp, et reconnaissent une séquence d'au moins quatre acides aminés en amont du site de clivage. Une approche combinatoire a été utilisée pour déterminer la spécificité de plusieurs caspases pour des substrats tetrapeptidiques (Thornberry *et al.*, 1997). Ces résultats ont mené à un classement en trois catégories, selon la séquence préférentiellement reconnue : le groupe I, vise la séquence WEHD et comprend les caspase-1, -4, -5 (impliquées dans la médiation de l'inflammation); le groupe II (caspase-2, -3 et -7), cible le tetrapeptide DEXD et démontre la plus grande sélectivité; le groupe III (caspase-6, -8, -9 et -10), préfère le motif (I/L/V)EXD (X représente n'importe quel acide aminé). Les différentes spécificités des caspases déterminent les substrats cellulaires clivés par chacune.

1.2.1.2 Activité et substrats

Parce que l'inhibition de l'activité des caspases ralentit ou prévient la plupart des modifications cellulaires caractéristiques de l'apoptose, les caspases sont considérées comme ayant un rôle primordial dans le démantèlement ordonné de la cellule. En effet, plusieurs modifications morphologiques peuvent être imputées, du moins en partie, à l'action des caspases. Par exemple, la condensation de la chromatine ainsi que la condensation, le bourgeonnement et la fragmentation du noyau requièrent le clivage des lamines nucléaires par des caspases (Rao *et al.*, 1996; Buendia *et al.*, 1999). La perte de forme générale de la cellule est causée par la digestion de protéines du cytosquelette, comme la vimentine (Byun *et al.*, 2001) et l'actine (Stroh et Schulze-Osthoff, 1998). La fodrine et la gelsoline sont activées par les caspases et participent aussi à la dégradation du cytosquelette (Martin *et al.*, 1995; Kothakota *et al.*, 1997). Le bourgeonnement de la membrane plasmique et la formation de corps apoptotiques requièrent PAK2, un membre de la famille des kinases activées par p21, dont l'activité est régulée par les caspases (Rudel et Bokoch, 1997). De plus, pendant l'apoptose, les caspases sont responsables de l'augmentation de l'activité CDK (*cyclin-dependent kinase*), nécessaire pour plusieurs éléments de la morphologie apoptotique; mais les mécanismes d'action des CDK dans l'exécution de l'apoptose demeurent inconnus (voir Chang et Yang, 2000).

Fait intéressant, les caspases sont aussi responsables de l'activation de la nucléase qui produit l'« échelle » d'ADNg, un marqueur de l'apoptose très utilisé. Cette nucléase, renommée CAD (*caspase-activated DNase*), clive l'ADN entre les nucléosomes, générant ainsi des fragments dont les longueurs correspondent à des multiples d'environ 180 pb. Dans les cellules vivantes, la CAD est complexée à une sous-unité inhibitrice, appelée ICAD (*inhibitor of CAD*); l'activation de CAD dépend du clivage de ICAD par la caspase-3, ce qui libère la CAD active (revue par Nagata, 2000).

Plus d'une centaine de substrats cellulaires des caspases ont été identifiés (voir Earnshaw *et al.*, 1999) et la liste s'allonge continuellement.

1.2.1.3 Modes d'activation

Pour être activées, la plupart des procaspases doivent être clivées. Trois mécanismes généraux d'activation des caspases ont été décrits : le clivage par une caspase active, l'autoactivation par proximité induite et l'association avec un régulateur (figure 2).

Les sites de clivage des procaspases correspondent à des séquences reconnues par des caspases. Ainsi, un moyen simple et efficace d'activer une procaspase est de l'exposer à une caspase (initiatrice) active. Les caspases effectrices -3, -6 et -7, responsables de la dégradation d'une variété de substrats cellulaires, sont fréquemment activées par cette « cascade de caspases ». Cette cascade permet l'amplification du signal apoptotique, en clivant d'autres caspases. Par exemple, une fois activée (par la caspase-8 ou -9), la caspase-3 peut activer la caspase-2 et la caspase-6; cette dernière peut ensuite activer la caspase-10 et la caspase-8, et ainsi de suite (voir Adrain et Martin, 2001). Cependant, ce mécanisme n'explique pas comment la première caspase de la cascade pourrait être activée; les deux autres modes d'activation proposent des réponses à cette question.

Le modèle d'activation par proximité induite est né de l'étude de la caspase-8, reconnue comme un facteur majeur de l'apoptose initiée par les récepteurs de mort (voir section 1.2.2). Ces récepteurs avec leur ligand forment de gros complexes qui recrutent plusieurs molécules de procaspases-8. La proximité des procaspases-8 dans ces complexes suffit pour que leur faible activité protéolytique intrinsèque permette leur clivage mutuel et leur activation subséquente (Muzio *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998a; Salvesen et Dixit, 1999).

Plusieurs autres procaspases, dont CED-3, peuvent aussi s'activer d'une manière similaire. En effet, la seule caspase de *C. elegans* s'active grâce à son association avec l'adaptateur CED-4, qui s'agglutine lors de l'apoptose, ce qui permet le rapprochement et l'autoactivation de CED-3 (Yang *et al.*, 1998b). Le mécanisme d'activation par proximité induite est sans doute régulé de manière plus complexe que le clivage par une caspase active et plusieurs interrogations subsistent, notamment sur les manières exactes par lesquelles le clivage est régulé et effectué au sein de ces complexes protéiques.

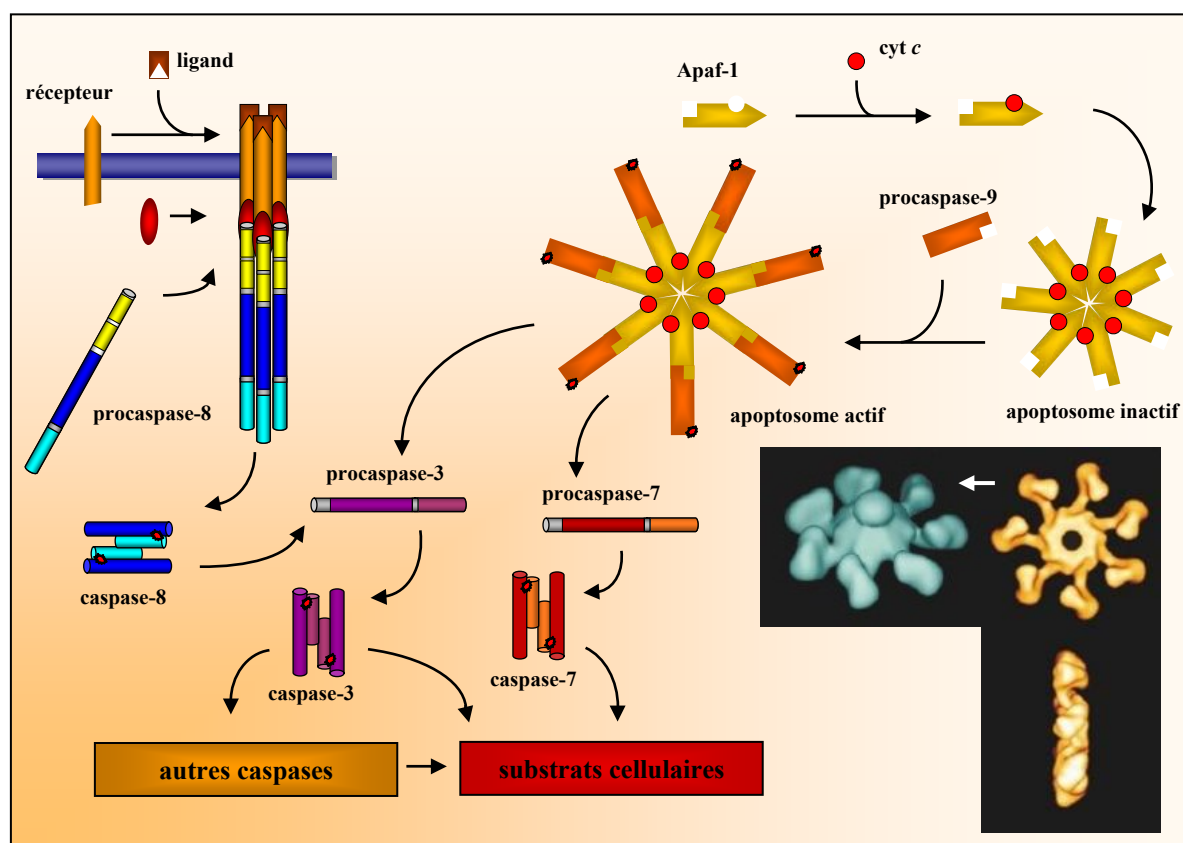


Figure 2 Modes d'activation des caspases. Les caspases initiatrices sont activées soit par la proximité induite lors de la multimérisation d'un récepteur (en haut à gauche) soit par l'activation par une sous-unité régulatrice, comme le complexe formé d'Apaf-1 et du cytochrome *c* (à droite). Une fois activées, les caspases initiatrices amorcent une cascade d'activation de caspases qui s'amplifie et permet l'attaque d'une variété de cibles cellulaires. La structure en heptamère de l'apoptosome révélée par microscopie cryo-électronique (en médaillon; tiré de Acehan *et al.*, 2002) est montrée avant (en orange) et après (en bleu) la liaison de la procaspase-9.

Le mode d'activation qui semble le plus complexe nécessite l'association avec une sous-unité régulatrice, comme c'est le cas pour la caspase-9 avec Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor-1*, un homologue de CED-4). Contrairement à la plupart des caspases, le clivage de la procaspase-9 n'a que peu d'effet sur son activité catalytique (Stennicke *et al.*, 1999); c'est plutôt l'association avec Apaf-1 qui est responsable de l'activation de l'holoenzyme (Rodriguez et Lazebnik, 1999). L'oligomérisation d'Apaf-1, en présence d'ATP et de cytochrome *c*, permet le recrutement de procaspases-9 *via* leur domaine CARD pour former un très gros complexe (~ 700-1400 kDa) appelé apoptosome, au sein duquel la procaspase-9 s'active et amorce une cascade de caspases en clivant les caspase-3 et -7 (revu par Adrain et Martin, 2001). La stochiométrie et la structure de l'apoptosome, ainsi que le mode d'activation de la caspase-9 demeurent flous. Certaines données semblent indiquer que le rapport Apaf-1 : caspase-9 est près de 1 : 1 mais la proportion de cytochrome *c* demeure inconnue et on ne sait toujours pas si sa présence est transitoire dans le complexe (Adrain et Martin, 2001). Quant à la structure de l'apoptosome, une étude en microscopie cryo-électronique a permis de déterminer grossièrement (résolution de 27 Å) une structure heptamérique en forme de roue (Acehan *et al.*, 2002) (figure 2). Cette structure a mené à la formulation de différentes hypothèses quant au mécanisme d'activation de la procaspase-9 au sein de l'holoenzyme (Shi, 2002).

Étant donné les conséquences graves que pourraient entraîner une activité caspase inappropriée, celle-ci doit être contrôlée de manière stricte. Par exemple, les IAP (*inhibitors of apoptosis*) semblent être un moyen utilisé pour réprimer les caspases initiées par accident et éviter ainsi l'amplification de la cascade. Les protéines de cette famille inhibent les caspase-3, -7, -8 et -9 en s'y liant, mais plusieurs autres fonctions leur ont aussi été attribuées notamment dans la régulation du cycle cellulaire et dans la transduction du signal de récepteurs membranaires (revues de Yang et Xiao, 2000; Salvesen et Duckett, 2002).

Deux sentiers majeurs perçoivent et intègrent des signaux de survie et de mort et régulent le déclenchement des cascades de caspases. Les signaux provenant de l'environnement extracellulaire sont généralement perçus par des récepteurs de mort (section 1.2.2), alors que les signaux intracellulaires passent par la mitochondrie (section 1.2.3). Cependant, il est à noter que ces deux sentiers ne sont pas mutuellement exclusifs (voir section 1.2.2.1).

1.2.2 Régulation I : récepteurs de mort (et de survie ?)

Un des sentiers classiques par lequel les cellules reçoivent de l'information de leur environnement et y réagissent implique des protéines de surface cellulaire de la famille du TNFR (*tumor necrosis factor receptor*) nommées « récepteurs de mort ». Parmi ceux-ci, notons Fas (aussi appelé CD95) et TNF-R1, qui serviront ici d'exemples. La liaison de leur ligand entraîne rapidement la formation de complexes de régulation et de signalisation qui activent soit des sentiers qui déclenchent les cascades de caspases entraînant l'apoptose, soit des sentiers qui la préviennent (revues de Ashkenazi et Dixit, 1997; Gupta, 2002; Wajant, 2002).

1.2.2.1 La mort en Fas

Le cas de Fas fournit le modèle le plus simple de déclenchement de l'apoptose par les récepteurs de mort (voir Ashkenazi et Dixit, 1997) (figure 3). En présence de son ligand (FasL), Fas s'agglomère en trimère et recrute, *via* son domaine cytoplasmique DD (*death domain*), l'adaptateur FADD (*Fas associated death domain*) par une interaction DD-DD. FADD contient aussi un DED et recrute à son tour des procaspases-8 par une interaction entre des domaines DED homologues. La proximité induite des molécules de procaspase-8 dans le complexe suffit à l'autoactivation et conduit à la libération de caspases-8 actives (voir section 1.2.1.3). Les mécanismes exacts qui gouvernent ces associations entre des domaines identiques pour la formation du complexe sont encore inconnus, mais on peut supposer que des changements de conformation induits par la liaison des partenaires sont impliqués.

Une fois la caspase-8 activée de cette manière, deux scénarios ont été décrits (voir Budihardjo *et al.*, 1999; Kaufmann et Hengartner, 2001). Chez certaines lignées cellulaires (appelées type I), comme une panoplie de lignées lymphoïdes, la caspase-8 déclenche la cascade de caspases en clivant la procaspase-3. Par contre, chez les autres cellules (type II), l'activité de la caspase-8 est beaucoup moins grande et ne suffit généralement pas à l'activation directe de la procaspase-3; mais l'apoptose survient quand même, quelque peu retardée. Dans ce cas, la faible activité de la caspase-8 permet le clivage de Bid (un membre de la famille de Bcl-2), qui peut alors causer la fuite du cytochrome *c* des mitochondries et l'activation subséquente de la caspase-9 et de la cascade de caspases (Li *et al.*, 1998; Luo *et*

al., 1998). Ainsi, contrairement à l'idée véhiculée jusqu'alors, l'activation de la cascade de caspases *via* les récepteurs de mort et la mitochondrie ne sont pas des mécanismes mutuellement exclusifs. Par ailleurs, de nouvelles fonctions qui ne semblent pas liées à la signalisation apoptotique ont récemment été attribuées à Fas (revue de Wajant, 2002).

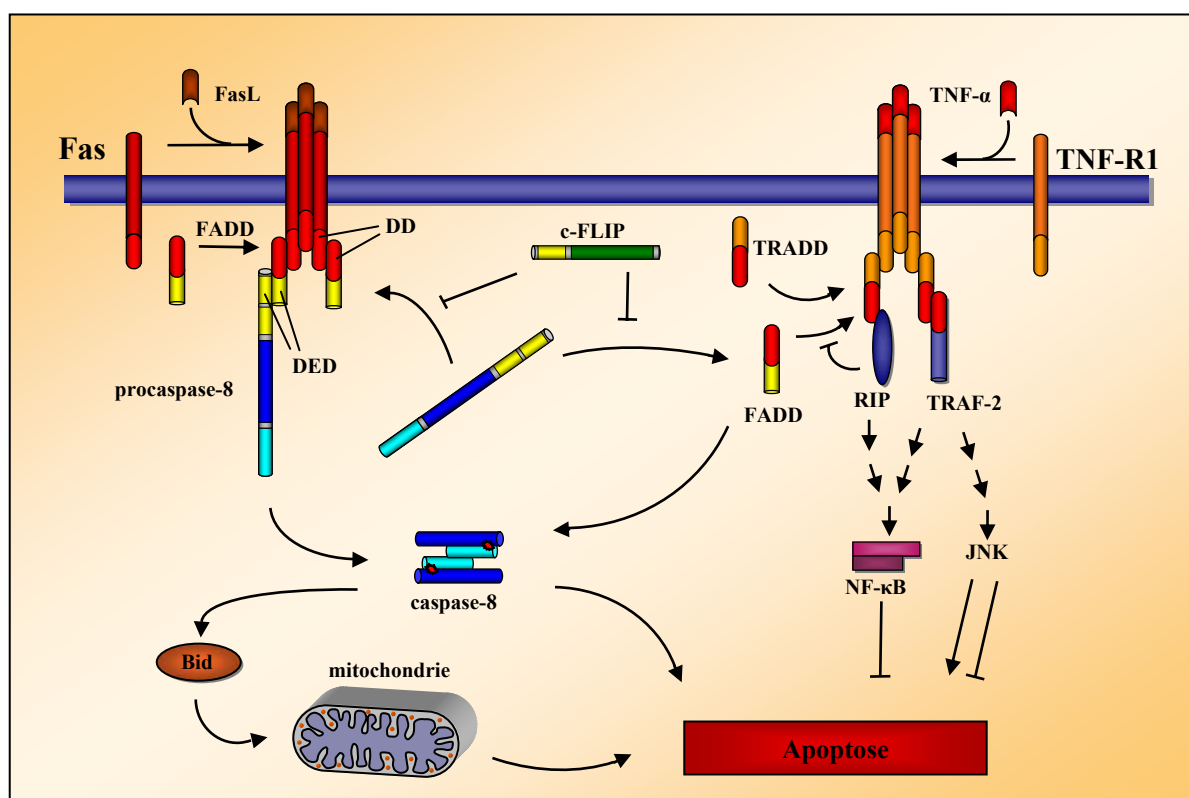


Figure 3 Régulation de l'apoptose par les récepteurs de mort. La signalisation par Fas induit l'apoptose alors que le TNF-R1 peut induire ou réprimer la mort. (Seulement quelques sentiers et régulateurs majeurs ont été représentés; voir les explications dans le texte.)

1.2.2.2 Les TNFR : question de vie ou de mort

La régulation par les TNFR est plus complexe que par Fas, puisque plusieurs sentiers pro- et anti-apoptotiques peuvent être activés par la liaison du TNF- α (figure 3) (revue de Gupta, 2002) et par d'autres ligands. Dans un premier temps, le TNF-R1 peut activer les caspases d'une manière similaire à Fas. La liaison du TNF- α cause la trimérisation du récepteur qui

recrute l'adaptateur TRADD (*TNF receptor associated death domain*) qui s'associe à son tour à FADD. La présence de FADD dans le complexe permet le recrutement et l'activation de la procaspase-8, qui peut déclencher l'apoptose soit en activant les caspases effectrices directement, soit en amorçant le sentier apoptotique mitochondrial par le clivage de Bid.

Mais la liaison du TNF- α au TNF-R1 peut aussi résulter en signaux de survie, lorsque TRADD lie d'autres médiateurs. Le régulateur RIP (*receptor interactive protein*) est indispensable à l'activation de l'anti-apoptotique NF- κ B (*nuclear factor κ B*) par le TNF-R1 et interfère avec la liaison entre TRADD et FADD (qui conduit à l'activation de la procaspase-8) en s'associant transitoirement à TRADD. Lorsque la caspase-8 est activée (c.-à-d. lors de l'apoptose), elle clive RIP rapidement; un des produits, RIPc, interagit plus fortement avec TRADD et favorise le recrutement de FADD (et l'activation subséquente des caspases), tout en bloquant l'activation de NF- κ B (Lin *et al.*, 1999). Ainsi, RIP et RIPc semblent jouer un rôle important dans la régulation du signal (de survie ou de mort) induit par le TNF-R1.

Si RIP est nécessaire à l'activation de NF- κ B par le TNF- α dans plusieurs systèmes, on ne sait pas exactement comment il y parvient (pour une revue des développements récents concernant NF- κ B, voir Gupta, 2002; Li et Stark, 2002). NF- κ B désigne aussi une famille de facteurs de transcription dimériques formés d'homo- ou d'hétérodimères de protéines de la famille de Rel (dont p50 et RelA, qui forment le dimère prédominant nommé à l'origine NF- κ B). Chez les cellules non stimulées, ces dimères sont séquestrés dans le cytoplasme par la liaison de protéines de la famille de I κ B (*inhibitor κ B*) qui masquent la séquence de localisation nucléaire de NF- κ B et interfèrent avec des motifs importants pour sa liaison à l'ADN. Plus de 150 signaux extracellulaires peuvent activer le NF- κ B en causant la dissociation de I κ B. Ces signaux convergent vers la phosphorylation de IKK (I κ B kinase), qui phosphoryle à son tour I κ B, ce qui cause son ubiquitination et sa dégradation au protéasome (figure 4). Le NF- κ B ainsi libéré se dirige au noyau où il est phosphorylé et peut exercer son action en augmentant la transcription de plusieurs gènes dont les produits ont un effet anti-apoptotique. Parmi ceux-ci, des IAP (cIAP-1 et -2, XIAP) qui inhibent directement des caspases; c-FLIP, qui empêche l'activation de la procaspase-8 en se liant au DD de FADD et favorise l'activation de NF- κ B en recrutant des protéines comme RIP;

et l'adaptateur TRAF-2 (*TNF receptor associated factor-2*), qui aussi peut lier TRADD dans le complexe avec le récepteur pour déclencher des cascades de kinases qui conduisent à l'activation de la signalisation soit par NF- κ B, soit par la JNK (*c-Jun N-terminal protein kinase*).

La signalisation par la JNK est complexe et peut avoir des effets anti- ou pro-apoptotiques, selon le stimulus et le type cellulaire (revue de Lin, 2003). Son action est due à l'activation de facteurs de transcription (comme les pro-apoptotiques p53 et c-Myc) et d'autres régulateurs tels les anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-X_L. Par ailleurs, NF- κ B peut aussi protéger la cellule de la mort en agissant sur le sentier mitochondrial. Par exemple, la transcription de Bcl-X_L, A-1 et Bcl-2 est favorisée par NF- κ B, quoi qu'il n'y ait pas de

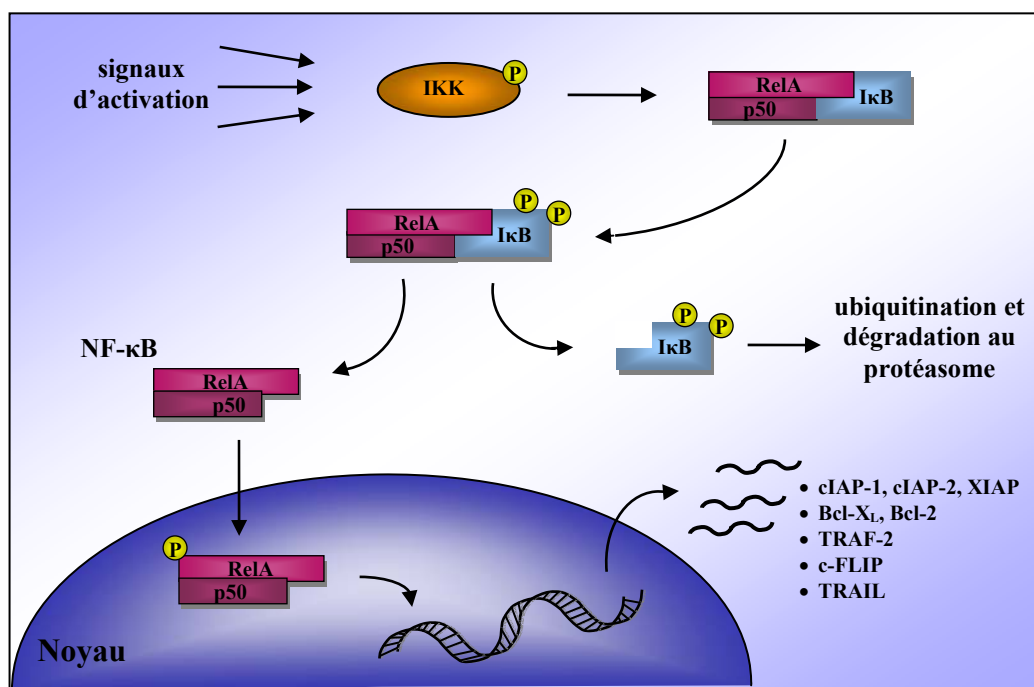


Figure 4 Activation de NF- κ B et son action anti-apoptotique. Plusieurs signaux conduisent à la phosphorylation de l'inhibiteur de NF- κ B (I κ B) par IKK, ce qui dissocie I κ B et permet à NF- κ B de se diriger au noyau où il favorise la transcription de gènes dont les produits préviennent l'apoptose.

preuve que cette action soit directe dans le cas de Bcl-2 (Tamatani *et al.*, 1999; Zong *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2000). Aussi, NF- κ B inhibe indirectement l'expression du pro-apoptotique Bax en faisant compétition à p53 pour un co-activateur de transcription (Bentires-Alj *et al.*, 2001).

Et ce n'est pas tout. Plusieurs anti-apoptotiques impliqués dans la régulation de ces sentiers (comme IKK, TRAF-2, NF- κ B, cIAP-1, XIAP et Bcl-X_L) peuvent être inactivés par des caspases, ce qui constitue un moyen d'arrêter la signalisation de survie au besoin. De plus, dans le cas de Bcl-X_L et des IAP, des fragments ainsi produits ont une action pro-apoptotique (voir Gupta, 2002).

Les ROS (*reactive oxygen species*) semblent aussi jouer un rôle majeur dans la signalisation induite par le TNF et leur régulation au niveau des TNFR peut induire des signaux de survie ou de mort, comme l'activation de NF- κ B ou des dommages à la mitochondrie, respectivement (revue de Garg et Aggarwal, 2002). Fait intéressant, il a récemment été démontré que l'augmentation intracellulaire des ROS déclenchée par les TNFR passe par TRAF-2, dépend de la chaîne de transport d'électrons de la mitochondrie et peut être inhibée par l'action de Bcl-2 et Bcl-X_L (Chandel *et al.*, 2001).

Ces dernières années, une autre classe de récepteurs de la famille du TNFR a attiré beaucoup l'attention puisque leur ligand, TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*), induit l'apoptose spécifiquement chez les cellules cancéreuses (et non chez les cellules normales), ce qui présente un intérêt thérapeutique particulier (revue de Baetu et Hiscott, 2002). Les autres ligands de la famille du TNF, comme FasL et TNF- α , ont des effets toxiques sur les tissus normaux *in vivo*; la stimulation de Fas par un anticorps anti-Fas cause des dommages majeurs au foie, alors que l'administration de TNF- α cause une réponse inflammatoire mortelle. L'expression de TRAIL aussi est régulée entre autres par NF- κ B, et plusieurs récepteurs de TRAIL ont été identifiés. TRAIL-R1 et TRAIL-R2 contiennent des DD cytoplasmiques et induisent des signaux pro-apoptotiques *via* FADD et l'activation de la procaspase-8, mais aussi *via* JNK. D'autres récepteurs, tels les TRAIL-R3 et TRAIL-R4, ne contiennent pas de DD cytoplasmique fonctionnel et préviennent plutôt l'apoptose en séquestrant le ligand (d'où leur surnom de « récepteur leurre ») et en induisant l'activation du NF- κ B, possiblement *via* TRADD, TRAF-2 et RIP (Ashkenazi et

Dixit, 1997). Plusieurs lignées cancéreuses semblent exprimer préférentiellement les récepteurs de mort TRAIL-R1 et -R2, alors que les cellules normales expriment préférentiellement les TRAIL-R3 et -R4, expliquant ainsi l'induction spécifique de l'apoptose chez les cellules cancéreuses et suggérant que la régulation de la signalisation induite par TRAIL implique un contrôle de l'expression des différents récepteurs de TRAIL (Baetu et Hiscott, 2002).

Comme on a pu le voir, la régulation de la signalisation par les récepteurs de mort est complexe. Plusieurs ligands, récepteurs, adaptateurs et régulateurs peuvent se combiner différemment pour finalement produire divers signaux, souvent de nature antagoniste. Certains sentiers semblent dépendre du type cellulaire et sont influencés par plusieurs signaux intra- et extracellulaires. Des régulateurs peuvent avoir une action sur plusieurs autres régulateurs, créant de nombreuses boucles de rétroactivation et rétroinhibition. Cette complexité suggère l'intégration continue des signaux extracellulaires de survie et de mort par une machinerie régulatrice à la fois souple et puissante. La voie des récepteurs de mort peut aussi influencer la régulation mitochondriale de l'apoptose, en agissant sur la chaîne de transport des électrons et sur des membres de la famille de Bcl-2.

1.2.3 Régulation II : la famille de Bcl-2 et la mitochondrie

La mitochondrie est reconnue comme étant un point d'intégration majeur des signaux de mort ou de survie engendrés par une panoplie de stimuli intra- et extracellulaires. Suite à un stimulus apoptotique, l'homéostasie de la membrane mitochondriale est perturbée, le cytochrome *c* entre autres, est relâché de l'espace intermembranaire et déclenche la cascade de caspases amorcée par la formation de l'apoptosome (voir section 1.2.1.3). Les membres de la famille de Bcl-2 jouent un rôle crucial dans la régulation du sentier mitochondrial. Une quantité astronomique de littérature a été publiée à ce sujet; pour une vue d'ensemble de différentes perspectives, le lecteur est dirigé vers les revues de Gross *et al.*, 1999; Adams et Cory, 2001; Antonsson, 2001; Parone *et al.*, 2002; Borner, 2003; et vers le résumé qui suit.

Le gène *bcl-2* a initialement été découvert à la jonction de la translocation chromosomique t(14;18) retrouvée chez des cellules B cancéreuses (Cleary *et al.*, 1986), et la prolifération

excessive de ces cellules a été expliquée par la surexpression de *bcl-2* résultant de cette translocation, qui empêchait leur mort normale (Vaux *et al.*, 1988). Quelques années plus tard, Bax (*Bcl-2-associated protein X*), le premier pro-apoptotique de la famille, a été identifié grâce à sa capacité à former un hétérodimère avec Bcl-2 (Oltvai *et al.*, 1993). Lorsque surexprimé, Bax, retrouvé en homodimère, accélère la mort apoptotique et élimine l'effet protecteur conféré par la surexpression de Bcl-2. Ces données ont conduit à un modèle où le ratio des membres pro- *versus* anti-apoptotiques, *via* leurs interactions mutuelles, détermine le sort de la cellule (Korsmeyer *et al.*, 1993; Oltvai *et al.*, 1993).

Depuis, plusieurs protéines avec des fonctions antagonistes dans l'apoptose ont été reliées à la famille de Bcl-2, grâce à leur homologie de séquence dans de courtes régions conservées nommées domaines BH (pour *Bcl-2 homology*) (figure 5). Contrairement à *C. elegans*, qui ne possède que deux membres de la famille de Bcl-2 (CED-9, homologue à Bcl-2, et EGL-1, un pro-apoptotique), une trentaine de membres ont été identifiés chez les mammifères. Les membres de la famille de Bcl-2 peuvent être divisés en trois groupes, selon leur fonction et leur structure : les anti-apoptotiques (comme Bcl-2 et Bcl-X_L), les pro-apoptotiques multidomaines, comportant plusieurs domaines BH (dont Bax) et finalement, les (nombreux) pro-apoptotiques comprenant seulement le domaine BH3 (Bid, Bad et Bik, par exemple). Plusieurs membres de la famille de Bcl-2 (des trois groupes) possèdent aussi un domaine transmembranaire (TM) en C-terminal qui permet leur localisation aux membranes des organelles, comme la mitochondrie et le réticulum endoplasmique (RE), où ils exercent leur action.

La dernière décennie nous a beaucoup appris sur les membres de la famille de Bcl-2, leur régulation et leur activité (particulièrement à la mitochondrie). Mais plusieurs des mécanismes moléculaires régissant l'équilibre entre la vie et la mort ne sont pas entièrement compris.

1.2.3.1 Les protéines : relation structure-fonction

Malgré une similarité relativement faible dans l'ensemble, les membres de la famille de Bcl-2 présentent jusqu'à quatre domaines très conservés, les BH1-4, compris dans des hélices α (figure 5). Les anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1, A-1, BOO/DIVA et Bcl-B, entre autres) contiennent généralement les quatre domaines BH, en plus d'un

segment hydrophobe en C-terminal qui les dirige aux membranes des organelles. Des études de mutagenèse dirigée, de délétions et de mutants de CED-9 ont montré que les domaines BH sont requis pour la liaison des pro-apoptotiques et pour leur activité anti-apoptotique (Hengartner et Horvitz, 1994; Yin *et al.*, 1994; Hanada *et al.*, 1995; Reed, 1998). Fait intéressant, plusieurs protéines virales (comme E1B-19K, ORF16, KS-Bcl-2 et BHRF1) font aussi partie de cette catégorie, mais aucun homologue viral pro-apoptotique n'a encore été identifié (Borner, 2003). Les protéines virales n'ont typiquement que le TM à l'extrémité C-terminale ainsi que les domaines BH1 et BH2.

Les membres pro-apoptotiques multidomaines (dont Bax, Bak et Bok) possèdent les domaines BH1, BH2, BH3 et le TM à l'extrémité C-terminale. Bcl-X_S constitue une exception, avec seulement les domaines BH3 et BH4 en plus du TM. À noter, suite à un signal de mort, les anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-X_L peuvent être convertis en pro-apoptotiques par l'élimination protéolytique de leur domaine BH4 de l'extrémité N-terminale (Cheng *et al.*, 1997; Clem *et al.*, 1998). Cependant, plusieurs arguments suggèrent que le domaine BH4 à lui seul n'est pas la clef qui détermine l'activité de survie ou de mort des membres munis de plusieurs domaines. Parmi ceux-ci, l'existence de plusieurs anti-apoptotiques (viraux) sans BH4, la présence d'un BH4 dans Bcl-X_S et le fait que Bax contienne un BH4 dégénéré en N-terminal (voir Borner, 2003). Les pro-apoptotiques contenant seulement le domaine BH3, court (~ 12-16 a.a.) et mal défini, constituent un groupe hétérogène, dont Bid, Bad, Bim, Bik, Blk, Bmf, NOXA et PUMA font partie. Certains possèdent une extrémité C-terminale hydrophobe (Bik, Blk, Bim), alors que d'autres n'en ont pas (Bad, Bid, Bmf, NOXA et PUMA).

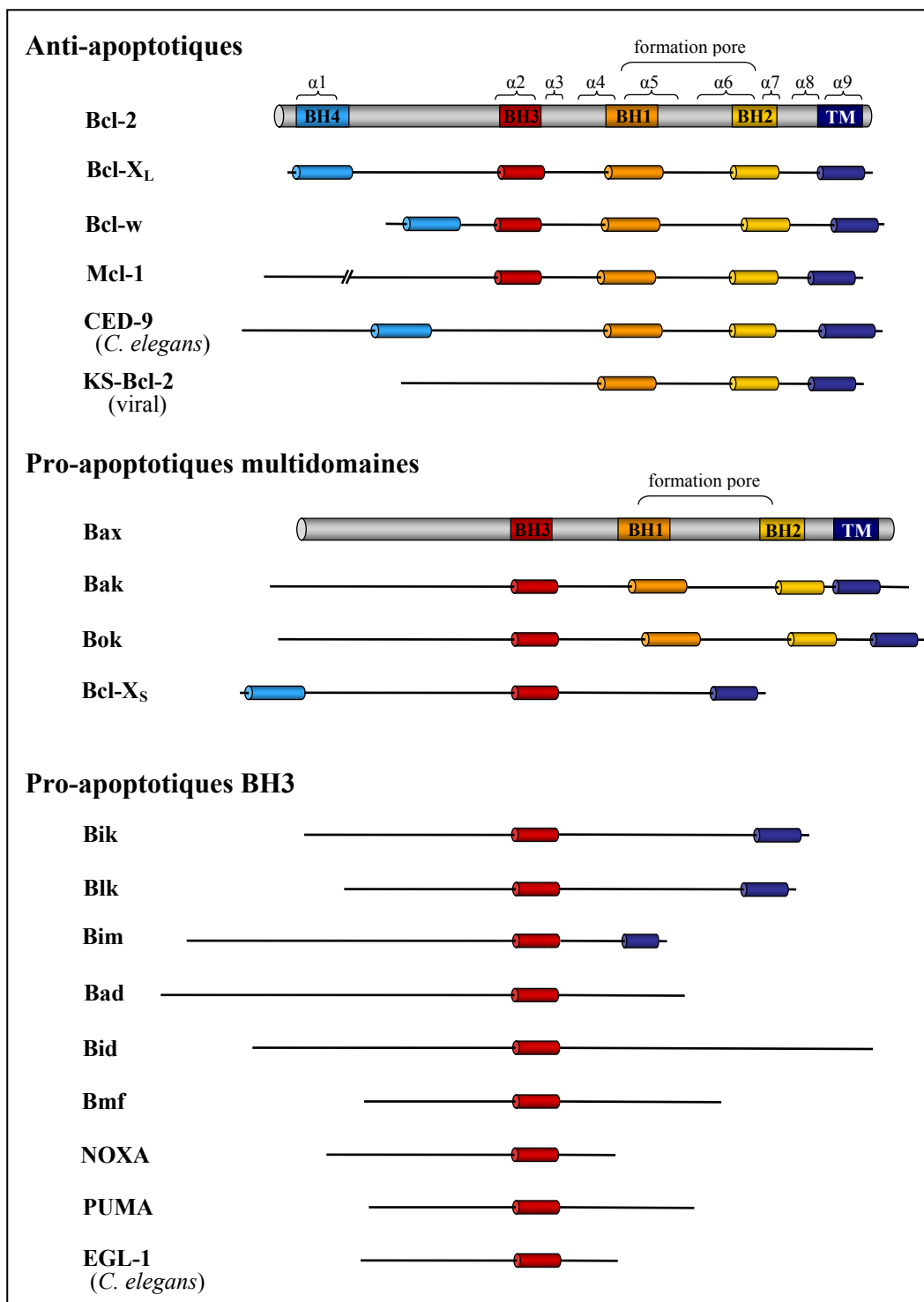


Figure 5 Classification des membres de la famille de Bcl-2. Seulement certains membres représentatifs sont montrés et sont retrouvés chez les mammifères, sauf mention contraire. Les domaines BH et les segments transmembranaires (TM) sont indiqués. La position des hélices α est montrée pour Bcl-2. Voir le texte pour les détails.

Les interactions entre les membres de la famille de Bcl-2 ont été révélées par plusieurs études utilisant différentes approches comme la co-immunoprécipitation, le système deux hybrides dans la levure et des essais de liaison *in vitro* et de « crosslinking ». Ces travaux ont permis de déterminer que le domaine BH3 des pro-apoptotiques est nécessaire pour leur liaison aux anti-apoptotiques, et dans le cas des multidomains, pour leur homodimérisation. Le BH3 est aussi essentiel à l'activité des pro-apoptotiques avec seulement le domaine BH3; mais les pro-apoptotiques multidomains retiennent (parfois seulement en partie) leur activité lorsque leur BH3 est modifié de manière à empêcher la dimérisation (Zha *et al.*, 1996a; Zha *et al.*, 1997; Reed, 1998; Antonsson, 2001; Borner, 2003).

La détermination des structures tridimensionnelles de membres des différents sous-groupes de la famille de Bcl-2 a beaucoup fait avancer notre compréhension des mécanismes régissant leur activité. La première structure déterminée par RMN, celle de Bcl-X_L, a révélé une surprenante similarité à des protéines bactériennes, les colicines et la toxine de la diphtérie. Ces deux protéines bactériennes forment des pores dans les membranes, ce qui suggère un mécanisme d'action pour les membres de la famille de Bcl-2 (Muchmore *et al.*, 1996). Ces protéines contiennent deux hélices α hydrophobes ($\alpha 5$ et $\alpha 6$) centrales pouvant traverser une membrane, entourées d'hélices amphipatiques. Les domaines BH1-3 de Bcl-X_L et de Bcl-2 forment un sillon hydrophobe en surface, stabilisé par derrière par l'hélice BH4, dans lequel peut se nicher un peptide correspondant au BH3 de pro-apoptotiques (Bak et Bad), sous forme d'hélice amphipatique (alors que le peptide libre en solution adopte une conformation aléatoire) (figure 6A) (Muchmore *et al.*, 1996; Sattler *et al.*, 1997; Petros *et al.*, 2001). Le sillon hydrophobe de Bcl-2 diffère légèrement de celui de Bcl-X_L de par sa topologie et son potentiel électrostatique, suggérant des affinités différentes pour différents partenaires (Petros *et al.*, 2001). Étonnamment, l'homologue viral KS-Bcl-2, qui ne possède pas les BH3 et BH4, adopte aussi une conformation similaire à celles de Bcl-2 et Bcl-X_L dans l'ensemble, mais l'affinité de peptides BH3 de pro-apoptotiques diffère beaucoup de celles de Bcl-X_L et Bcl-2 (Huang *et al.*, 2002); ce qui suggère que les homologues viraux pourraient ainsi échapper à la modulation de leur activité par les pro-

apoptotiques à laquelle sont soumis les homologues cellulaires (Hardwick et Bellows, 2003).

Les structures des pro-apoptotiques Bid et Bax, qui possèdent respectivement seulement un BH3 et plusieurs domaines, sont elles aussi similaires à celles des anti-apoptotiques. Leur BH3 est cependant moins exposé et demeure en place par la face hydrophobe de l'hélice amphiphatique, qui interagit avec l'hélice N-terminale (Chou *et al.*, 1999; McDonnell *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 2000). Le clivage de Bid par la caspase-8 provoque la translocation mitochondriale du Bid tronqué (tBid) et le déclenchement de l'apoptose (Li *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998). Ce clivage survient dans la boucle entre les hélices $\alpha 2$ et $\alpha 3$ et expose une grande surface hydrophobe auparavant enfouie, dont font partie la face hydrophobe de l'hélice BH3 et les deux hélices hydrophobes centrales (McDonnell *et al.*, 1999). La structure de Bax, déterminée avec l'extrémité hydrophobe C-terminale, montre que l'hélice en C-terminal est repliée dans le sillon hydrophobe formé par les BH1-3 (figure 6B) et

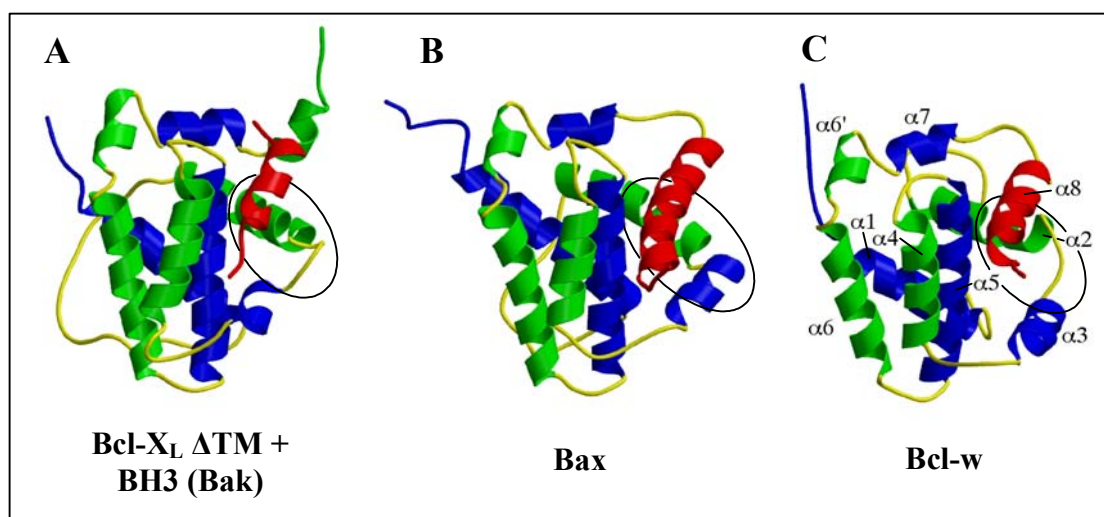


Figure 6 Structure des membres de la famille de Bcl-2. (A) Les domaines BH1-3 de Bcl-X_L (structure déterminée sans TM) forment un sillon hydrophobe pouvant accueillir un peptide correspondant au BH3 de Bak (en rouge). (B-C) Les queues TM (en rouge) de Bax et Bcl-w sont repliées dans leur sillon hydrophobe, ce qui constitue un moyen de réguler son accès. Les domaines BH3 sont encerclés approximativement. Le déploiement du TM de Bax expose davantage son BH3 (non montré). Les hélices portant un numéro pair sont en vert, les impairs en bleu (sur la base de la numérotation de Bcl-w ; représentations des structures tirées de Denisov *et al.*, 2003).

stabilisée dans cette position par l'extrémité N-terminale (Suzuki *et al.*, 2000). Le changement de conformation qui libère l'hélice C-terminale permet l'interaction de Bax avec divers partenaires et provoque sa localisation aux mitochondries où il exerce son action agoniste de mort (Nechushtan *et al.*, 1999). L'ensemble de ces données démontre l'importance des changements de conformation pour l'activation des pro-apoptotiques, en exposant la face hydrophobe de l'hélice BH3 (pour la liaison au sillon hydrophobe d'une autre protéine) et, dans le cas de Bax, en déployant l'hélice TM C-terminale (pour la translocation à la mitochondrie), ce qui libère aussi le sillon hydrophobe (pour la liaison d'un BH3 exposé). De plus, les structures prédites pour les fragments tronqués (pro-apoptotiques) de Bcl-2 et Bcl-X_L exposent leur hélice BH3, tout comme les structures prédites pour les autres pro-apoptotiques contenant seulement le domaine BH3 (Gross *et al.*, 1999).

Récemment, la structure de l'anti-apoptotique Bcl-w a aussi été déterminée (Denisov *et al.*, 2003; Hinds *et al.*, 2003). Malgré un repliement similaire à celui des autres multidomaines, l'extrémité C-terminale est retenue dans le sillon hydrophobe, comme dans le cas de Bax (figure 6B-C). Des peptides BH3 de pro-apoptotiques font compétition à l'hélice C-terminale et la déplacent du sillon hydrophobe. Ces données suggèrent que l'extrémité C-terminale de Bcl-w pourrait réguler sa liaison aux pro-apoptotiques (Denisov *et al.*, 2003; Hinds *et al.*, 2003), ce qui pourrait aussi être le cas pour d'autres anti-apoptotiques (les structures déterminées ne comprennent pas de TM) et contribuent au modèle expliquant l'activation de Bax par les pro-apoptotiques BH3 (Desagher *et al.*, 1999; Eskes *et al.*, 2000).

L'ensemble de ces résultats fournit un cadre structurel pour la régulation mutuelle des membres de la famille de Bcl-2. Dans ce cadre, les pro-apoptotiques « activés » présentent une hélice BH3 qui lie le sillon hydrophobe des protéines anti-apoptotiques, situées aux membranes des organelles, inhibant leur activité. Les pro-apoptotiques multidomaines (comme Bax et Bak) peuvent aussi être activées par la liaison d'un BH3, ce qui cause des changements de conformation essentiels à leur action sur la mitochondrie. Mais les membres de la famille de Bcl-2 sont régulés à plusieurs autres niveaux.

1.2.3.2 Régulation transcriptionnelle et post-traductionnelle

Les changements de conformation modulent l'activité de certains membres de la famille de Bcl-2. Dans le cas du pro-apoptotique Bid, le changement de conformation, qui libère son hélice BH3, est provoqué par le clivage de son extrémité N-terminale par la caspase-8. Par contre, d'autres pro-apoptotiques BH3 sont prédits avoir une hélice BH3 toujours exposée (Gross *et al.*, 1999) et nécessitent ainsi d'autres types de mécanismes pour expliquer leur rôle de tueurs potentiels.

La variation du niveau de transcription est un moyen de réguler l'activité des membres de la famille de Bcl-2. La régulation transcriptionnelle de plusieurs anti-apoptotiques, dont Bcl-X_L, Bcl-2, Mcl-1 et A-1, a aussi été démontrée depuis (Kozopas *et al.*, 1993; Boise *et al.*, 1995; Grumont *et al.*, 1999; Tamatani *et al.*, 1999; Zong *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2000). La modulation de l'expression contrôle aussi l'activité d'EGL-1, le seul pro-apoptotique de la famille de Bcl-2 chez *C. elegans*. Selon le type cellulaire et le stade du développement du nématode, le niveau d'expression d'EGL-1 est favorisé ou réprimé par plusieurs facteurs de transcription (Conradt et Horvitz, 1999; Metzstein et Horvitz, 1999). Chez les mammifères, le facteur de transcription p53 est impliqué dans l'apoptose induite notamment par les dommages à l'ADN causés par les radiations UV et γ ou par des agents utilisés en chimiothérapie. Son rôle dans une panoplie de cancers humains est connu depuis longtemps puisque des mutations dans p53 ont été retrouvées dans une grande proportion des cas, d'où l'appellation de « suppresseur de tumeur » (Nigro *et al.*, 1989). Par exemple, p53 active la transcription de Bax (Miyashita et Reed, 1995), qui peut être inhibée par la compétition de NF- κ B pour un co-activateur (Bentires-Alj *et al.*, 2001). Deux membres relativement nouveaux de la famille de Bcl-2, NOXA et PUMA (des BH3), sont aussi régulés au niveau transcriptionnel par p53. Les deux protéines sont dirigées vers les mitochondries, où elles induisent l'apoptose en liant les anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-X_L (Oda *et al.*, 2000; Nakano et Vousden, 2001). Fait intéressant, p53 peut aussi exercer son action apoptotique indépendamment de la régulation de la transcription. Récemment, il a été démontré qu'une proportion de p53 se dirige à la mitochondrie suivant un stimulus apoptotique, où il induit la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe en se complexant à Bcl-2 et Bcl-X_L *via* son domaine de liaison à l'ADN (Mihara *et al.*, 2003).

La phosphorylation est aussi utilisée pour contrôler l'activité des membres de la famille de Bcl-2. Le cas du pro-apoptotique Bad (seulement BH3) est bien connu. La phosphorylation de Bad sur plusieurs résidus sérine empêche son interaction avec les anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-X_L (et le déclenchement de l'apoptose) et permet sa séquestration au cytosol *via* sa liaison avec la protéine 14-3-3 (Zha *et al.*, 1996c). La phosphorylation de Bad a été attribuée à plusieurs kinases. Par exemple, les résidus sérine 112 et 136 sont phosphorylés par la sérine/thréonine kinase Akt en réponse aux facteurs de croissance, ce qui cause la séquestration cytosolique (Datta *et al.*, 1997). La PKA de la membrane mitochondriale peut aussi phosphoryler Bad, notamment à la sérine 155 du BH3, ce qui nuit directement à l'interaction avec les anti-apoptotiques (Harada *et al.*, 1999; Datta *et al.*, 2000). La déphosphorylation de Bad le libère de 14-3-3 ce qui permet son interaction avec les anti-apoptotiques de la membrane mitochondriale. La calcineurine, une phosphatase dépendante du calcium, peut accomplir cette tâche (Wang *et al.*, 1999), expliquant ainsi l'induction de l'apoptose par une élévation du calcium cytosolique. Par ailleurs, l'activation de Bid par la caspase-8 peut aussi être prévenue par sa phosphorylation par les caséine kinases I et II (Desagher *et al.*, 2001). Par contre, dans le cas du BH3 Bik, la phosphorylation augmente son potentiel pro-apoptotique, indépendamment de sa capacité à lier Bcl-2 (Verma *et al.*, 2001). La phosphorylation peut aussi inactiver Bcl-2 (Haldar *et al.*, 1995). La phosphorylation représente donc un mécanisme majeur de régulation des membres de la famille de Bcl-2.

L'activité des pro-apoptotiques peut aussi être contrôlée en les séquestrant loin des organelles où sont situés les régulateurs anti-apoptotiques. Par exemple, Bim est maintenu lié aux microtubules des cellules saines en vertu de son association avec la chaîne légère LC8 du complexe moteur de la dyénine. Suite à certains stimuli apoptotiques, Bim (toujours lié à LC8 ou non) est relâché des microtubules et exerce son rôle en liant les anti-apoptotiques (Puthalakath *et al.*, 1999). Un autre pro-apoptotique BH3 relativement nouveau, Bmf, est aussi séquestré au cytosquelette, mais plutôt au niveau du complexe moteur myosine V du cytosquelette d'actine. Bmf est libéré en réponse au détachement des cellules de leur matrice ou en présence d'agents causant la dépolymérisation de l'actine, et peut alors lier les anti-apoptotiques (Puthalakath *et al.*, 2001). Il semble donc que le rôle Bim et Bmf soit de percevoir et rapporter les dommages du cytosquelette.

La compartimentation est aussi généralement considérée comme majeure dans la régulation de Bax. Le modèle qui prévaut stipule que, dans les cellules normales, Bax est majoritairement séquestré au cytosol et que suite à un signal apoptotique, Bax change de conformation et se dirige alors vers la membrane mitochondriale externe où il peut exercer son pouvoir apoptotique. Si cette règle semble bien s'appliquer aux tissus, chez beaucoup de lignées de cellules en culture, Bax est normalement distribué à parts égales entre les mitochondries et le cytosol (Borner, 2003). Il doit donc exister un facteur ou un mécanisme chez ces lignées en culture qui dirige constitutivement une partie des molécules de Bax aux mitochondries. Quoi qu'il en soit, divers signaux se sont vus attribuer un rôle dans l'induction de la translocation de Bax. La dimérisation de Bax a longtemps été assumée jouer un rôle important dans son changement de localisation (Reed, 1998; Gross *et al.*, 1999). Par contre, il est suspecté que l'effet observé soit dû à divers artefacts expérimentaux et ne constitue pas un mécanisme important dans la régulation de la localisation de Bax *in vivo* (voir Antonsson, 2001; Borner, 2003). Par ailleurs, dans certains cas, une hausse du pH intracellulaire global ou l'acidification du cytosol et la basification mitochondriale coïncident avec la translocation de Bax et l'apoptose par le sentier mitochondrial; cependant, il n'est vraiment pas clair si ces changements de pH sont une cause ou une résultante de la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (voir Antonsson, 2001). Les mécanismes exacts gouvernant la translocation de Bax aux mitochondries sont donc encore très mal compris. Pour sa part, Bak est retrouvé aux mitochondries de cellules normales, où il est lié à Bcl-X_L; divers agents induisant l'apoptose causent un changement de conformation de Bak et la dissociation de Bcl-X_L (Griffiths *et al.*, 1999). Malgré que Bax et Bak semblent fonctionnellement redondants, comme suggéré par les souris *knockout* (Lindsten *et al.*, 2000), il a récemment été proposé que leurs modes de régulation et d'activité ne sont pas exactement les mêmes (revue de Esposti et Dive, 2003).

Ensemble, ces données soutiennent le modèle actuel où les pro-apoptotiques BH3 agissent en « percevant » les signaux de mort à divers endroits dans la cellule et en transmettant ceux-ci, *via* la neutralisation des anti-apoptotiques et l'activation des pro-apoptotiques multidomains, ce qui cause la fuite du cytochrome *c* des mitochondries et l'activation des

caspases. Mais quels sont donc les mécanismes expliquant l'activité des membres de la famille de Bcl-2 à la mitochondrie ?

1.2.3.3 Faire la peau aux mito...

L'induction de la voie apoptotique mitochondriale cause la dissipation de la différence de potentiel de la membrane mitochondriale ($\Delta\Psi_m$) et le relâchement dans le cytosol de plusieurs protéines de l'espace intermembranaire. Parmi celles-ci, évidemment le cytochrome *c* mais aussi AIF (*apoptosis-inducing factor*; revue de Candé *et al.*, 2002), l'endonucléase G (Li *et al.*, 2001), Smac/DIABLO (qui inhibe les IAP; Du *et al.*, 2000; Verhagen *et al.*, 2000) et Htr2A/Omi (une sérine protéase qui inhibe les IAP mais agit aussi de par son activité protéolytique; Suzuki *et al.*, 2001; Hegde *et al.*, 2002). La membrane mitochondriale externe doit donc être perméabilisée d'une manière ou d'une autre, sélective ou non. Plusieurs mécanismes ont été suggérés pour expliquer l'action des pro-apoptotiques: *i*) formation de canaux, *ii*) formation de pores lipidiques, *iii*) formation de canaux chimériques et *iv*) ouverture de pores existants (figure 7). Des arguments pour et contre existent pour chacun et, étant donné la diversité des modèles expérimentaux utilisés, il est souvent difficile de discerner entre les mécanismes impliqués. Il est plausible de supposer l'existence de plusieurs mécanismes tout dépendant des types cellulaires et des contextes physiopathologiques.

La similarité structurelle des membres de la famille de Bcl-2 avec des toxines formant des pores dans les membranes a suggéré un mécanisme d'action. Étonnamment, à la fois les pro- et les anti-apoptotiques peuvent former des canaux ioniques dans des membranes artificielles; par contre, les anti-apoptotiques nécessitent un très bas pH (moins de 5,5; optimum à pH 4,0) alors que Bax forme des canaux à pH physiologique (mais l'activité augmente à bas pH) (Schlesinger *et al.*, 1997). Bax peut aussi causer la fuite du cytochrome *c* de liposomes (Saito *et al.*, 2000) et de mitochondries isolées (Jurgensmeier *et al.*, 1998), mais aussi lorsque surexprimé chez des cellules animales ou des levures (qui n'ont pas d'homologues de Bcl-2 et de ce fait constituent un outil intéressant pour l'étude fonctionnelle des membres de la famille de Bcl-2 indépendamment les uns des autres). Dans plusieurs cas, l'oligomérisation de Bax accompagnait l'activité de canal membranaire et cette oligomérisation est prévenue par les anti-apoptotiques. Mais la taille des complexes

observés variait beaucoup (du petit dimère jusqu'à des amas de milliers de molécules de Bax, en passant par les tetramères, hexamères et octamères) et cette variation pourrait être due à la surexpression ou aux méthodes analytiques employées (voir Antonsson, 2001; Borner, 2003). Par exemple, les gros oligomères pourraient être formés suite à la saturation des sites de liaison à la mitochondrie, et pourraient être partiellement instables lorsqu'ils

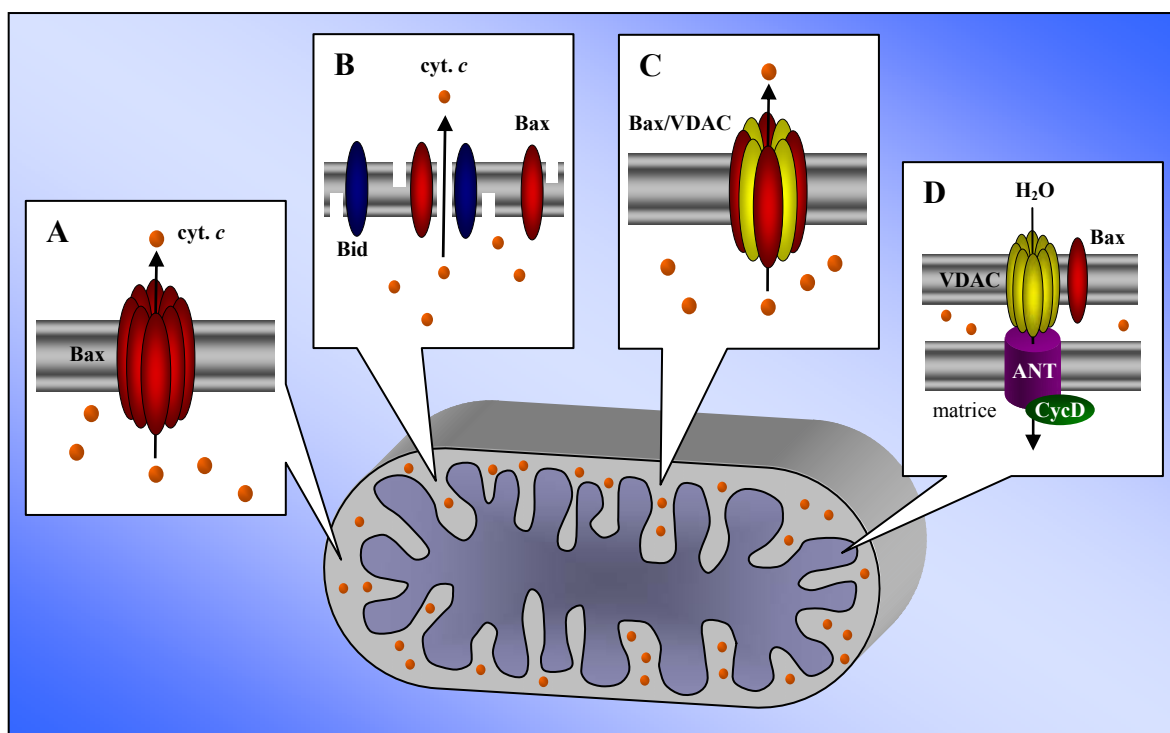


Figure 7 Mécanismes de perméabilisation de la membrane mitochondriale externe par les pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2. (A) Formation de canaux par Bax ou Bak. **(B)** Déstabilisation de la membrane par Bax ou tBid. **(C)** Formation de canaux chimériques, comme Bax/VDAC. **(D)** Ouverture du PTP (qui comprend entre autres VDAC, ANT et la cyclophiline D), par exemple sous l'influence de Bax, ce qui cause un appel d'eau dans la matrice qui conduit à l'éclatement de la membrane externe.

sont analysés par SDS-PAGE. De plus, plusieurs détergents non ioniques provoquent l'oligomérisation de Bax et la dimérisation Bax/Bcl-2 (Hsu et Youle, 1997, 1998). Ainsi, la

nécessité absolue de l'oligomérisation des pro-apoptotiques multidomains pour leur activité de canal demeure débattue. Et si c'était effectivement le cas, la structure du canal oligomérique formé est loin d'être résolue.

Un autre scénario expliquant la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe par les pro-apoptotiques sans la collaboration d'autres protéines implique la déstabilisation de la structure lipidique. En effet, contrairement à Bcl-X_L, Bax peut avoir un effet déstabilisateur sur des membranes artificielles (qui dépend de sa concentration) et pourrait ainsi participer à la formation de « pores lipidiques » (Basanez *et al.*, 1999). Il a aussi été démontré que tBid, qui ne possède pas de domaine hydrophobe en C-terminal, peut se diriger aux mitochondries grâce à son interaction avec la cardiolipine, un lipide spécifique à la membrane mitochondriale (Lutter *et al.*, 2000). Similairement à Bax, tBid a une activité déstabilisatrice de membranes artificielles (alors que Bid n'en a pas) (Kudla *et al.*, 2000). De plus, Bid et tBid montrent une activité de transfert de lipides et peuvent incorporer divers lysolipides aux membranes de mitochondries isolées (Esposti *et al.*, 2001; Esposti, 2002). L'ensemble de ces résultats suggère que Bax et tBid peuvent directement fragiliser la structure lipidique de la membrane mitochondriale ou, tout au moins, grandement faciliter l'insertion de canaux transmembranaires. Par contre, cette activité n'a pas encore été démontrée dans un système cellulaire.

Il a aussi été suggéré que les pro-apoptotiques multidomains pourraient collaborer avec d'autres protéines de la membrane mitochondriale pour former des canaux chimériques. Une de ces protéines pourrait être VDAC (*voltage-dependent anion channel*). En présence de Bax ou Bak, VDAC peut causer la fuite du cytochrome *c* de liposomes, alors que les protéines ne sont pas actives indépendamment; de plus, une souche de levure déficiente en VDAC-1 devient insensible à la fuite du cytochrome *c* induite par l'expression de Bax (Shimizu *et al.*, 1999). Ces résultats contrastent avec ceux de Saito *et al.* (2000), qui démontrent que Bax peut perméabiliser des liposomes au cytochrome *c*, ainsi que ceux de Priault *et al.* (1999), Harris *et al.* (2000) et Gross *et al.* (2000), qui concluent que chez les levures, Bax peut causer le relâchement du cytochrome *c* des mitochondries et induire la mort indépendamment de VDAC. Une autre protéine de la membrane mitochondriale, ANT (*adenine nucleotide transporter*), peut s'associer à Bax, et des levures sans ANT

deviennent résistantes à l'expression de Bax (Marzo *et al.*, 1998a). La présence de Bax augmente l'activité canal de ANT dans des membranes artificielles et Bcl-2 l'inhibe complètement (Brenner *et al.*, 2000). Mais des concentrations physiologiques d'ATP empêchent aussi cette activité; et ANT qui est normalement situé dans la membrane mitochondriale interne devrait pouvoir interagir avec Bax seulement aux points où les deux membranes sont très près. La participation de Bax dans la formation de canaux chimériques demeure donc controversée.

Un mécanisme potentiel qui a fait couler beaucoup d'encre implique la régulation du PTP (*permeability transition pore*) mitochondrial par les membres de la famille de Bcl-2. Le PTP traverse les deux membranes mitochondriales aux sites de contact et transporte l'ADP, l'ATP et d'autres petites molécules (< 1500 Da). Les composants principaux du PTP sont VDAC (membrane externe), ANT (membrane interne) et la cyclophiline D (matrice), mais comprend d'autres protéines (comme la créatine kinase de l'espace intermembranaire et l'hexokinase cytosolique) et sa composition exacte demeure incertaine (Gross *et al.*, 1999; Antonsson, 2001). On croit que le PTP pourrait servir à dissiper le gradient de protons de la membrane interne et ainsi découpler la chaîne de transport d'électrons de la production d'ATP. L'ouverture du PTP peut causer le gonflement de la matrice (probablement par appel d'eau) et l'éclatement subséquent de la membrane externe. Certains auteurs stipulent que les pro-apoptotiques pourraient s'associer au PTP et permettre le passage de molécules beaucoup plus grosses qu'à l'habitude, comme le cytochrome *c* (15 kDa) ou AIF (57 kDa) (Desagher et Martinou, 2000). L'un des principaux arguments en faveur d'une régulation du PTP s'appuie sur la perte du $\Delta\Psi_m$ observée lors de l'apoptose. De plus, certains membres de la famille de Bcl-2 peuvent interagir avec des composantes du PTP, comme discuté plus haut. Plusieurs études ont montré l'inhibition du relâchement du cytochrome *c* par des inhibiteurs de l'ouverture du PTP (comme la cyclosporine A) lors de l'apoptose induite par Bax, mais d'autres équipes ont montré le contraire; de plus, il semble que le blocage du PTP par des inhibiteurs ne fait que retarder l'apoptose, sans l'arrêter complètement (Desagher et Martinou, 2000). Bcl-2 et Bcl-X_L peuvent inhiber l'ouverture (causée, entre autres, par le Ca²⁺) d'un PTP reconstitué dans des liposomes (Marzo *et al.*, 1998b). L'ouverture du PTP a aussi été induite par Bax chez des mitochondries isolées, mais cette activité dépend de la présence de Ca²⁺ (Narita *et al.*, 1998). Par ailleurs, le $\Delta\Psi_m$

peut être maintenu (de même que certaines fonctions mitochondriales) après la fuite du cytochrome *c* et l'activation des caspases, suggérant que la perte du $\Delta\Psi_m$ pourrait servir de boucle de rétroactivation plutôt que d'événement initiateur (Waterhouse *et al.*, 2001). Il a aussi été démontré par microscopie électronique que les structures des mitochondries sont préservées lors de la fuite du cytochrome *c* induite par Bid ou Bax et qu'elles n'éclatent que très rarement (von Ahsen *et al.*, 2000), suggérant que l'ouverture du PTP n'est pas impliquée. Aussi, il est difficile de supposer que les protéines de l'espace intermembranaire pourraient passer par le PTP, qui traverse les deux membranes et dont l'intérieur est isolé de l'espace intermembranaire (Borner, 2003). L'implication exacte de l'ouverture du PTP dans l'apoptose et sa régulation par la famille de Bcl-2 demeure donc débattue.

Outre la régulation de la perméabilisation de la membrane externe, les membres de la famille de Bcl-2 pourraient être impliqués à divers niveaux dans l'homéostasie mitochondriale. On sait depuis longtemps que Bcl-2 peut agir directement comme anti-oxydant et limiter la peroxydation des lipides (Hockenbery *et al.*, 1993). Il a aussi été démontré que Bcl-X_L peut contribuer à maintenir la concentration d'ADP de la matrice (Vander Heiden *et al.*, 1999), prévenant ainsi l'inhibition de la F₀F₁ ATP synthase (qui utilise le $\Delta\Psi_m$) et conséquemment, le découplage de la respiration et de la production d'ATP. Une étude a aussi suggéré que Bcl-2 pouvait maintenir le $\Delta\Psi_m$ suivant divers signaux de mort en causant un efflux de protons de la mitochondrie (Shimizu *et al.*, 1998). Par ailleurs, Bax a été associé à la perturbation de la chaîne respiratoire. L'expression de Bax cause l'acidification du cytosol, l'alcalinisation de la matrice mitochondriale et la mort de la cellule; la co-expression de Bcl-2 peut prévenir ces effets et des levures sans F₀F₁ ATP synthase sont aussi résistantes à ces effets (Matsuyama *et al.*, 2000). La toxicité de Bax chez la levure a aussi été attribuée à une altération de la phosphorylation oxydative, puisque des souches déficientes en certains de ses composants (rendant ces cellules inaptes à la respiration) sont moins sensibles à la mort induite par Bax (Harris *et al.*, 2000).

Ainsi, les mécanismes d'action exacts des membres de la famille de Bcl-2 à la mitochondrie *in vivo* demeurent flous. On peut cependant supposer que les divers modèles discutés peuvent contribuer à l'activité en situation physiologique, mais que la contribution relative de chacun varie selon le type cellulaire et le stimulus apoptotique en amont.

1.2.3.4 Y a-t-il quelque chose avant la mitochondrie ? Le rôle du RE

La mitochondrie, en tant que site majeur de la régulation de l'apoptose par les membres de la famille de Bcl-2, a attiré beaucoup l'attention. Ce n'est que récemment que la réflexion s'est tournée vers le réticulum endoplasmique (RE), principal réservoir de Ca^{2+} de la cellule animale, malgré qu'il est connu depuis longtemps que Bcl-2 est aussi localisé au RE et que l'homéostasie du Ca^{2+} intracellulaire est souvent perturbée lors de l'apoptose. Une vue récente du lien entre le RE, le Ca^{2+} et l'apoptose est présentée par Orrenius *et al.*, 2003.

Plusieurs groupes ont démontré que les membres de la famille de Bcl-2 peuvent exercer leur action au niveau du RE. Une méthode souvent utilisée à cette fin consiste à diriger sélectivement les membres de la famille de Bcl-2 au RE ou à la mitochondrie en remplaçant leur TM par des domaines de localisation spécifiques pour ces organelles. Dans plusieurs cas (dépendamment du type cellulaire et du stimulus), l'effet anti-apoptotique de Bcl-2 dirigé au RE est aussi important que celui de Bcl-2 dirigé à la mitochondrie ou que celui de Bcl-2 non modifié; dans d'autres cas, la surexpression de Bcl-2 dirigé à la mitochondrie est moins efficace ou peut même induire l'apoptose (Zhu *et al.*, 1996; Rudner *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001). Il a aussi récemment été démontré que Bcl-2 dirigé au RE peut inhiber le relâchement du cytochrome *c* par un Bax modifié pour être localisé constitutivement aux mitochondries, notamment en séquestrant loin de la membrane mitochondriale un mutant de Bad toujours actif (Thomenius *et al.*, 2003). La distribution de Bcl-2 et Bcl-X_L au RE et à la mitochondrie est influencée par plusieurs facteurs, dont la sélectivité de leur TM (Bcl-X_L préfère la mitochondrie) et la liaison à la protéine mitochondriale FKBP38, ce qui suggère une régulation de leur localisation (Kaufmann *et al.*, 2003; Shirane et Nakayama, 2003; revu par Germain et Shore, 2003) qui pourrait impliquer des différences subtiles quant à leurs rôles physiologiques. Par ailleurs, le pro-apoptotique Bik (un BH3) se dirige au RE suite à un signal apoptotique, ce qui provoque la fuite du cytochrome *c* des mitochondries, tout comme l'expression d'un Bik modifié pour qu'il se dirige constitutivement au RE (Germain *et al.*, 2002; Mathai *et al.*, 2002). Bax et Bak ont aussi été trouvés associés au RE. Par exemple, lorsqu'ils sont surexprimés à l'aide d'un vecteur adénoviral à un niveau mimant leur majoration par des stimuli apoptotiques plus « conventionnels » (2-4 fois), Bax et Bak se répartissent entre les mitochondries et le RE (Nutt *et al.*, 2002b). Une combinaison d'observations en microscopies électronique et

confocale et de fractionnement cellulaire ont permis de déterminer que ~10 % du Bax et ~15 % du Bak endogènes aux cellules MEF se retrouvent au RE (Scorrano *et al.*, 2003) où ils peuvent aussi exercer leur action (voir plus loin). Mais quels sont donc les mécanismes de régulation de l'apoptose au RE et comment sont-ils influencés par les membres de la famille de Bcl-2 ?

Dans un premier temps, la cascade de caspases peut être activée directement à partir du RE (et déclencher la mort indépendamment de la mitochondrie). Bap31 est une protéine ancrée dans le RE et recrute dans un complexe (comprenant entre autres son homologue Bap29) la procaspase-8 qui peut s'y activer. Une fois active, la caspase-8 clive aussi Bap31 pour générer un fragment N-terminal pro-apoptotique. L'activation de la procaspase-8 est inhibée par la liaison de Bcl-2 au complexe et Bax empêche Bcl-2 de rejoindre le complexe sans lui-même s'y lier (Ng *et al.*, 1997; Breckenridge *et al.*, 2002). Récemment, il a été démontré, à l'aide d'un Bap31 résistant au clivage, que Bap31 non clivé empêche le relâchement du cytochrome *c* des mitochondries déclenché par Fas (et passant par tBid); Bap31 est aussi associé constitutivement à un canal ionique putatif du RE, qui participe à son action anti-apoptotique dans ce système (Wang *et al.*, 2003). Cependant, aucun homologue murin de Bap31 n'a été identifié à ce jour (Rudner *et al.*, 2002), ce qui ne permet donc pas de préciser son rôle physiologique à l'aide de souris *knockout*. Par ailleurs, il a aussi été rapporté que la procaspase-12, située majoritairement au RE, peut y être activée en réponse à divers agents chimiques causant des stress au RE (comme la perturbation de l'homéostasie du Ca^{2+} ou l'accumulation d'un excès de protéines), mais non à la suite de d'autres stimuli apoptotiques (agissant directement sur la mitochondrie) (Nakagawa *et al.*, 2000). Par contre, il n'y a pas d'homologue humain de la caspase-12 et les effets des membres la famille de Bcl-2 sur ce processus n'ont pas encore été étudiés.

Mais les membres de la famille de Bcl-2 semblent réguler l'apoptose au niveau du RE principalement en agissant sur l'homéostasie du Ca^{2+} intracellulaire (revues de Rudner *et al.*, 2002; Demarex et Distelhorst, 2003). La signalisation par le Ca^{2+} participe pratiquement à tous les aspects de la physiologie cellulaire. De plus, des mitochondries sont physiquement près du RE, à des sites de canaux relâchant le calcium (nommément IP_3R) et contribuent à retourner le Ca^{2+} au RE (Rizzuto *et al.*, 1998; Csordas *et al.*, 1999; Arnaudeau

et al., 2002). Cette proximité est importante dans la signalisation du Ca^{2+} et le métabolisme mitochondrial, et il semble maintenant qu'elle pourrait aussi jouer un rôle dans la régulation de l'apoptose. Une augmentation du Ca^{2+} de la matrice mitochondriale au-delà d'un certain niveau cause l'ouverture du PTP et le relâchement du cytochrome *c* de l'espace intermembranaire, un effet favorisé par la présence de Bax mais Bax peut aussi causer la fuite du cytochrome *c* indépendamment de l'élévation du Ca^{2+} (Gogvadze *et al.*, 2001). Les mouvements de Ca^{2+} du RE peuvent être contrôlés par les membres de la famille de Bcl-2. En utilisant des protéines fluorescentes sensibles au Ca^{2+} (comme l'aequorine ou Cam-4) dirigées au RE, il a été déterminé avec élégance que la surexpression de Bcl-2 diminuait le contenu en Ca^{2+} du RE et par conséquent la quantité de Ca^{2+} relâché en situation apoptotique (Lam *et al.*, 1994; Foyouzi-Youssefi *et al.*, 2000; Pinton *et al.*, 2000). Dans le même ordre d'idées, des manipulations qui provoquent une diminution de la concentration en Ca^{2+} du RE, comme l'inactivation de la calréticuline (qui agit normalement dans la lumière du RE en tamponnant le Ca^{2+}) ou l'utilisation d'agents chimiques, protègent de l'apoptose; par contre, un niveau plus élevé en Ca^{2+} au RE, comme par la surexpression de la pompe à calcium SERCA (*sarcoplasmic endoplasmic reticular Ca²⁺ ATPase*) ou de la calréticuline, a l'effet contraire (Nakamura *et al.*, 2000; Pinton *et al.*, 2001; Arnaudeau *et al.*, 2002). La quantité de Ca^{2+} en stock au RE est donc importante pour son rôle de signalisation de l'apoptose à la mitochondrie. Par ailleurs, la surexpression des pro-apoptotiques Bax et Bak cause la sortie du Ca^{2+} et sa reprise rapide par la mitochondrie, entraînant la fuite du cytochrome *c* des mitochondries et la mort cellulaire; ce processus peut être inhibé par Bcl-2 et déclenché par certains stimuli (Nutt *et al.*, 2002a; Nutt *et al.*, 2002b).

Récemment, Scorrano *et al.* (2003) ont beaucoup précisé le rôle de Bax et Bak dans le contrôle des flux de Ca^{2+} à l'aide de cellules de souris *bax^{-/-}bak^{-/-}* (figure 8). Fait intéressant, ces cellules (résistantes à plusieurs stimuli apoptotiques) montrent une faible quantité de Ca^{2+} stocké au RE (et conséquemment une faible augmentation de la concentration mitochondriale), suggérant que Bax et Bak contribuent à maintenir une réserve de Ca^{2+} au RE suffisante au déclenchement de la mort. La surexpression de la pompe SERCA corrige la quantité de Ca^{2+} au RE et rétablit la susceptibilité à des agents causant la sortie du Ca^{2+} du RE (comme l'acide arachidonique, le H_2O_2 ou le céramide) et sa reprise par les

mitochondries, indiquant qu'un flux de Ca^{2+} suffisant peut provoquer la mort indépendamment de Bax ou Bak (probablement par l'ouverture du PTP). De plus, l'expression d'un Bax modifié pour qu'il se dirige uniquement aux mitochondries rétablit la sensibilité de ces cellules double *knockout* à tBid, montrant la nécessité de Bax et l'indépendance du Ca^{2+} du RE pour l'exécution du signal transmis par tBid. L'effet de différents stimulus apoptotiques a été vérifié dans ce système, ce qui a permis de définir trois catégories de signaux : 1) ceux (comme le stress oxydatif, l'acide arachidonique ou le céramide) nécessitant seulement le flux de Ca^{2+} aux mitochondries (mais Bax peut augmenter l'effet du Ca^{2+} aux mitochondries); 2) ceux (comme tBid) qui arrivent directement aux mitochondries et dépendent de la présence de Bax sans la participation du Ca^{2+} et 3) les signaux qui déclenchent à la fois les deux sentiers précédents, comme la staurosporine, l'étoposide et l'activation du TCR (*T cell receptor*) (Scorrano *et al.*, 2003 et le commentaire de Demaux et Distelhorst, 2003). Beaucoup d'autres stimuli apoptotiques « classiques » restent à être classifiés à la lumière de ces données.

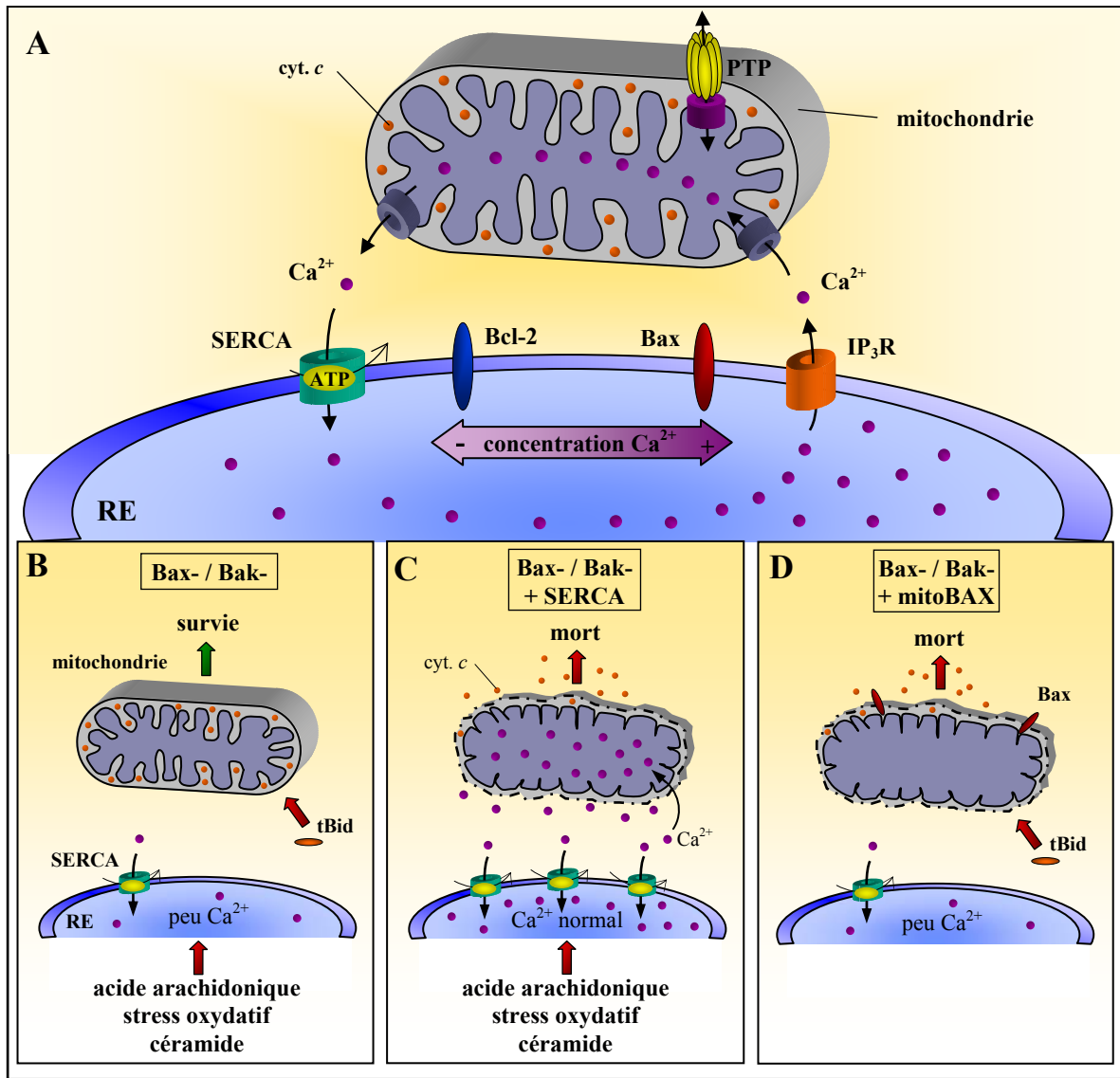


Figure 8 Les rôles du Ca^{2+} et de Bax. (A) La circulation du Ca^{2+} entre le RE et la mitochondrie fait partie des processus cellulaires normaux. Cette circulation repose sur la participation des canaux à Ca^{2+} de la mitochondrie et du RE, dont IP₃R et la pompe SERCA. Au RE, la quantité de Ca^{2+} en réserve reflète la balance pro-/anti-apoptotique. (B) Les cellules knockout *bax*^{-/-}*bak*^{-/-} ont une quantité moindre de Ca^{2+} en réserve et ne répondent pas aux signaux apoptotiques. (C) La surexpression de SERCA corrige la quantité de Ca^{2+} du RE et rétablit la sensibilité aux stimuli agissant au RE. (D) L'expression de Bax sélectivement aux mitochondries rétablit la sensibilité à tBid sans nécessiter la participation du Ca^{2+} . (Figure inspirée de celle de Demarex et Distelhorst, 2003).

L'ensemble de ces résultats a mené à l'extension au RE du modèle où l'équilibre entre les membres pro- et anti-apoptotiques contrôle le sort de la cellule. Les pro-apoptotiques favorisent le maintien d'un niveau de Ca^{2+} suffisant au RE et son largage en situation appropriée (en plus de sensibiliser les mitochondries à ses effets); les anti-apoptotiques causent un stockage réduit du Ca^{2+} au RE. La régulation au RE intervient donc en amont de la mitochondrie, où la signalisation par le Ca^{2+} est intégrée et l'apoptose déclenchée par le relâchement dans le cytoplasme d'une foule d'exécuteurs cellulaires. Par contre, les signaux en amont du RE sont encore mal connus et on ne sait pas comment les membres de la famille de Bcl-2 modulent la concentration en Ca^{2+} au voisinage du RE. Mais on peut toujours spéculer que les mécanismes envisagés au niveau de la mitochondrie, c.-à-d. la formation de canaux ou la collaboration avec des canaux existants, pourraient être impliqués (autant pour l'accumulation de Ca^{2+} au RE que son largage). Sauf que dans ce cas, les canaux participants pourraient être la pompe SERCA (pour l'entrée du Ca^{2+}), les canaux des récepteurs d' IP_3 ou de ryanodine (pour sa fuite selon le gradient) ou d'autres protéines de la membrane du RE, qui pourraient s'associer à des membres de la famille de Bcl-2 et former des canaux chimériques. Quoi qu'il en soit, notre conception du contrôle (complexe !) de l'apoptose par les membres de la famille de Bcl-2 sera sans doute éclairée par les nouvelles technologies à grande échelle de génomique-transcriptomique-protéomique, qui permettront une vue d'ensemble de la régulation de la transcription et des interactions protéine-protéine dans chaque situation et d'identifier (sans doute une panoplie) de nouveaux acteurs.

1.2.4 Mourir sans caspase ? La mort indigne et l'évolution des mœurs...

Depuis une dizaine d'années, l'apoptose est devenue un concept à la mode et la classification de la mort en nécrose ou apoptose a été très zélée. Même s'il y a longtemps qu'il a été observé que certains cas de PCD (particulièrement dans le développement et la différenciation cellulaire) possèdent des caractéristiques morphologiques et biochimiques différentes de celles de l'apoptose (comme la digestion massive du cytoplasme, indépendamment des caspases, d'où l'appellation de mort de type « autophagique ») (Schwartz *et al.*, 1993; et les revues de Bursch *et al.*, 2000 et de Klionsky et Emr, 2000), ces formes de mort ont souvent été ignorées ou confondues avec la nécrose. Ainsi,

plusieurs les ont « redécouvertes » et leur ont donné des noms (parfois douteux) comme nécrose programmée (!), apoptose atypique, apoptose indépendante des caspases ou PCD non-apoptotique, reflétant l'influence de la théorie dichotomique nécrose/apoptose et rendant difficile l'émergence d'une théorie unificatrice. Ce n'est que depuis quelques années que ces formes de mort méritent un peu d'attention, notamment à cause des implications évolutives de ces découvertes, mais la confusion demeure.

Cette confusion provient, entre autres, du manque de clarté sur l'importance de l'ablation de l'activité caspase qui n'est pas suffisante pour empêcher totalement la mort, ni même la prévenir du tout dans plusieurs cas (comme la privation de facteurs de croissance ou l'exposition à des glucocorticoïdes); de plus, il est aujourd'hui reconnu que plusieurs problèmes d'interprétation peuvent découler de l'utilisation des inhibiteurs de caspases souvent employés dans ce genre d'études (voir la revue de Lockshin et Zakeri, 2002). Ainsi, il est devenu évident que la mort programmée peut survenir sans l'action des caspases. Par exemple, Bax et Bak peuvent tuer des cellules de mammifères en présence d'inhibiteurs de caspases à large spectre (Xiang *et al.*, 1996; McCarthy *et al.*, 1997). Il est aussi reconnu que Bax et Bak peuvent tuer des levures même si elles n'ont pas de caspases endogènes, notamment grâce à leur action sur la mitochondrie (Zha *et al.*, 1996b; Ink *et al.*, 1997), un effet prévenu par les anti-apoptotiques. La PCD chez les levures est aussi associée à diverses situations physiologiques (comme la reproduction sexuée et l'adaptation à des conditions environnementales adverses) lors desquelles elle procure un avantage évolutif (revues d'Abeliovich et Klionsky, 2001 et Skulachev, 2002).

Plusieurs autres organismes ne possédant pas de caspases présentent aussi des formes de PCD qui diffèrent de l'apoptose. Divers exemples de mort programmée génétiquement sont retrouvés chez les bactéries, comme la réponse au manque de nutriments ou la présence d'un plasmide comprenant un « module de dépendance » qui tue les cellules qui ne le possèdent pas (revues par Yarmolinsky, 1995 et Ameisen, 2002). Plusieurs protéines et domaines impliqués dans l'apoptose animale présentent des similarités avec des protéines procaryotes, si bien que l'une des hypothèses actuelles stipule que la PCD eucaryote soit évolutivement aussi ancienne que l'endosymbiose de la mitochondrie (Ameisen, 2002; Koonin et Aravind, 2002). La PCD n'est donc pas réservée aux organismes multicellulaires

(contrairement à ce qu'il a longtemps été présumé) et procure aussi des avantages adaptatifs aux populations unicellulaires. À cet égard, le cas de la moisissure visqueuse *Dictyostelium discoideum* est particulièrement intéressant, puisque celle-ci présente une forme d'organisation multicellulaire primitive. En conditions difficiles, plusieurs cellules peuvent s'associer de manière ordonnée pour former les structures différenciées nécessaires à la production de spores, un processus nécessitant la PCD d'une partie des cellules (voir Ameisen, 2002). Par ailleurs, les caspases sont aussi absentes du règne végétal, malgré les nombreux cas de PCD (voir section 1.3.1). L'ensemble de ces données supporte l'idée que le phénotype apoptotique proprement dit est dû à l'activation de la cascade de caspases.

Chez des organismes ne possédant pas de caspases, des protéines dont les séquences possèdent une certaine homologie (et probablement un ancêtre commun) avec les caspases ont toutefois été retrouvées et nommées paracaspases (présentes notamment chez *C. elegans*, *D. discoideum* et quelques procaryotes) et métacaspases (chez les procaryotes, les levures, les protozoaires et les plantes) (Uren *et al.*, 2000; Koonin et Aravind, 2002; Lamkanfi *et al.*, 2002). La ressemblance de ces protéines avec les caspases se limite au motif catalytique caractéristique Cys-His de la sous-unité p20; elles n'ont pas de sous-unité p10. Une paracaspase humaine a aussi été identifiée et son implication dans la PCD a été démontrée (Uren *et al.*, 2000). Les fonctions de deux métacaspases (une de *Trypanosoma brucei* et une de *Saccharomyces cerevisiae*) ont été éclaircies chez la levure, chez laquelle elles se localisent au noyau (Szallies *et al.*, 2002). Celle de *T. brucei* entraîne la mort par dysfonction respiratoire (alors que quatre autres métacaspases du même organisme ne produisent pas de phénotype dans ce système); par contre, celle de *S. cerevisiae* ne produit pas de phénotype lorsque surexprimée ou supprimée, mais prévient la mort causée par la surexpression d'une protéine avec laquelle elle interagit (Szallies *et al.*, 2002). Par contre, une autre étude propose, pour la seule métacaspase de *S. cerevisiae* (renommée YCA1, pour *yeast caspase 1*), un rôle dans la mort similaire à celui des caspases humaines (Madeo *et al.*, 2002). YCA1 est activée par clivage, comme les caspases. Le H₂O₂ induit la PCD chez la levure qui est accompagnée d'une activité protéolytique similaire à celle des caspases; cette réponse est complètement inhibée par la suppression de YCA1 ou fortement stimulée par sa surexpression. YCA1 est aussi reliée à la mort dans les cultures vieillissantes (Madeo *et al.*, 2002). Par ailleurs, les végétaux possèdent au moins une

dizaine de métacaspases (Uren *et al.*, 2000; Koonin et Aravind, 2002; Lamkanfi *et al.*, 2002). La prolifération des métacaspases chez les plantes suggère un rôle important pour cette classe de protéines. Ainsi, les métacaspases pourraient donc bientôt se voir attribuer un rôle majeur dans la régulation de la PCD, mais les arguments soutenant un rôle possible dans le démantèlement cellulaire sont encore plutôt circonstanciels.

Plusieurs protéases autres que les caspases ont été impliquées dans la mort cellulaire. Dans plusieurs cas de PCD (apoptotique et autophagique), le système ubiquitine-protéasome joue un rôle majeur dans la régulation de la vie et de la mort (comme en dégradant l'inhibiteur de NF- κ B, TRAF2, des membres de la famille de Bcl-2, p53 ou des IAP) et la dégradation des constituants cytoplasmiques (Distelhorst, 2002). Par ailleurs, lors de la métamorphose de la glande salivaire de plusieurs insectes (dont *Drosophila* et *Manduca*), les premiers 90 % du processus se déroulent dans le style autophagique, alors que les 10 % restants adoptent des caractéristiques plutôt apoptotiques; lors de cette dernière phase, la calpaïne, une protéase dépendante du calcium, est activée, mais pas de caspases (Lockshin et Zakeri, 2002). De plus, la sérine protéase Omi/Htr2A est relâchée de l'espace intermembranaire des mitochondries lors de l'apoptose et peut exercer son action apoptotique indépendamment des caspases (Hegde *et al.*, 2002; Wolf et Green, 2002). Elle est homologue à la famille bactérienne bien caractérisée des sérine protéases HtrA et il semble que la version eucaryote, bien conservée, ait une origine mitochondriale (Koonin et Aravind, 2002). Par ailleurs, l'implication des lysosomes ou des vacuoles dans la dégradation des constituants cellulaires lors de la mort de type autophagique (aussi appelée lysosomale) est reconnue depuis longtemps (Bursch *et al.*, 2000; Klionsky et Emr, 2000). Un homologue humain d'un gène impliqué dans l'autophagie des levures (*hAPG5*) a été identifié grâce à l'induction de sa transcription lors de l'apoptose (Hammond *et al.*, 1998) et l'homologue humain de la protéine de levure APG6, Beclin 1, interagit avec Bcl-2 pour empêcher son action anti-apoptotique et est impliqué dans certains cancers (Liang *et al.*, 1999).

Par ailleurs, d'autres protéines favorisant la PCD indépendamment des caspases sont aussi relâchées des mitochondries. Parmi celles-ci, AIF constitue un cas intéressant. Phylogénétiquement ancien et très conservé chez les procaryotes et les eucaryotes (Koonin et Aravind, 2002), AIF peut favoriser la mort de plusieurs façons : en générant des ROS *via*

son activité NADH oxydase; en collaborant avec un facteur cytosolique (non identifié) pour perméabiliser la mitochondrie; ou encore en coopérant avec un facteur nucléaire pour causer la condensation de la chromatine en marge du noyau et la digestion de l'ADN en gros fragments (~50 kpb) (revue de Candé *et al.*, 2002). L'endonucléase G est aussi relâchée de l'espace intermembranaire des mitochondries et cause la fragmentation internucléosomale de l'ADN indépendamment des caspases (contrairement à la CAD) (Parrish *et al.*, 2001; van Loo *et al.*, 2001).

L'ensemble de ces résultats suggère que les différentes formes de PCD (apoptotique, autophagique ou autres) ne sont pas mutuellement exclusives, mais représentent plutôt un continuum (Lockshin et Zakeri, 2002), ce qui pourrait expliquer l'effet des membres de la famille de Bcl-2 sur les formes de mort indépendantes des caspases. Certains des nombreux sentiers impliqués semblent converger, d'autres être parallèles. Mais surtout, la PCD de type autophagique semble évolutivement beaucoup plus ancienne que l'apoptose. Si nos connaissances de ces formes de mort ne font qu'émerger, plusieurs concepts excitants en ont déjà découlé et devraient contribuer à redonner des lettres de noblesse à ces formes de mort. Dans cette optique, les plantes représentent un outil intéressant dans l'étude de l'évolution de la PCD.

1.3 La PCD chez les végétaux

L'importance évolutive d'un équilibre entre la vie et la mort pour les végétaux est aussi reconnue depuis longtemps (Léopold, 1961) et, au début des années 1970, plusieurs travaux de microscopie électronique ont décrit en détail les modifications morphologiques chez les cellules végétales en sénescence. Mais ce n'est qu'au cours des années 1990, avec la frénésie de l'apoptose chez les animaux, que la théorie de la PCD végétale s'est unifiée et a connu un essor substantiel stimulé entre autres par des intérêts agro-économiques comme la résistance des cultures aux pathogènes et aux stress environnementaux, l'augmentation des rendements et la conservation post-récolte.

D'un point de vue plus fondamental, la découverte que le Bcl-2 humain fonctionne aussi chez *C. elegans* (Vaux *et al.*, 1992) a lancé l'engouement pour la conservation évolutive des mécanismes de la PCD. Dès lors, on chercha à mettre en évidence les similarités

morphologiques et biochimiques de la mort survenant chez différents organismes et dans différentes circonstances, et cette tendance s'est élargie aux plantes (voir par exemple les revues de Mittler et Lam, 1996; Pennel et Lamb, 1997). Si plusieurs similarités très générales entre l'apoptose et la PCD végétale peuvent être dégagées (comme la condensation du cytoplasme, l'activation de protéases et de nucléases, la dégradation de l'ADN nucléaire en gros fragments et l'implication du Ca^{2+} et des ROS), des différences majeures chez les plantes (comme le rôle majeur de la vacuole et l'absence de la fragmentation du noyau, de la formation de corps apoptotiques englutis par les cellules avoisinantes et dans plusieurs cas, de la dégradation internucléosomale de l'ADN produisant les fameuses échelles sur gel d'agarose) suggèrent que le processus de PCD chez les végétaux est différent de l'apoptose animale. Cette idée a été renforcée lorsqu'on réalisa, avec la disponibilité de génomes de plantes, que celles-ci ne possèdent pas d'homologues de séquence des caspases ni des membres la famille de Bcl-2. Et ce n'est que depuis quelques années qu'on s'intéresse d'un peu plus près aux caractéristiques particulières des cellules végétales en PCD qui, plutôt que de s'avérer spécifiques, contribuent significativement à une théorie générale de la PCD et de l'évolution des eucaryotes. L'impact de l'étude de la PCD chez les plantes déborde donc largement du champ de la biologie végétale.

Cette section présente un survol rapide de divers modèles de la PCD chez les plantes (ci-dessous), des effecteurs de la mort (section 1.3.2) et des sentiers et des régulateurs impliqués (section 1.3.3) en les comparant avec les concepts issus des modèles animaux. Pour une revue plus élaborée de la PCD chez les plantes, voir l'édition spéciale de *Plant Molecular Biology*, volume 44 numéro 3, p.245-444 (2000) et les revues de Buckner *et al.*, 1998; Jones, 2001; Hoeberichts et Woltering, 2002; Kuriyama et Fukuda, 2002.

1.3.1 Paradigmes de PCD chez les plantes : un mode de vie

Tout au long de la vie des végétaux, différents types cellulaires ou organes sont éliminés au moment approprié, au profit de l'organisme et de la population, et constituent des modèles de PCD désormais classiques (figure 9). Au cours du développement normal, la germination, la différenciation, la croissance, la reproduction et le développement des graines impliquent la PCD (ci-dessous). Par ailleurs, les plantes ont aussi recours à la mort

contrôlée pour s'adapter et résister aux conditions adverses de leur environnement, comme le manque de nutriments, les températures extrêmes, l'hypoxie et l'attaque de pathogènes (section 1.3.1.2)

1.3.1.1 Développement et PCD

Les graines des plantes supérieures contiennent les réserves énergétiques nécessaires pour la germination (voir Raven *et al.*, 1999). Ces réserves doivent être hydrolysées pour fournir l'azote et le carbone nécessaires aux premiers stades de la vie de la plante. Chez les monocotylédones, comme le riz (*Oryza sativa*), le maïs (*Zea mays*), le blé (*Triticum aestivum*), l'orge (*Hordeum vulgare*) et l'avoine (*Avena sativa*), ces réserves sont entreposées dans l'endosperme, très riche en amidon, qui constitue la majeure partie de la graine. Une mince couche de cellules spécialisées de l'endosperme, l'aleurone, est située en périphérie de l'endosperme (figure 9) et contient les réserves protéiques et lipidiques ainsi que les enzymes hydrolytiques pour la dégradation des réserves d'amidon. Contrairement aux cellules de l'endosperme amylicé, les cellules de l'aleurone sont bien vivantes dans la graine mature et meurent par PCD lors de la germination (revue de Fath *et al.*, 2000). Ce processus est contrôlé par les phytohormones : l'acide gibbéréllique déclenche la mort et l'hydrolyse des réserves alors que l'acide abscisique la retarde. La mort des cellules de l'aleurone est caractérisée par la vacuolisation, l'activation d'une panoplie de nucléases et de protéases et la disparition des organelles et culmine avec une perte d'intégrité brusque de la membrane plasmique; la fragmentation internucléosomale de l'ADN et la fragmentation du noyau ne sont cependant pas observées (voir Fath *et al.*, 2000). Par contre, chez les dicotylédones avec peu d'endosperme (comme la fève mungo, *Vigna mungo*), les cotylédons ont, déjà dans la graine mature, absorbé la majorité de l'endosperme et contiennent les réserves destinées à la germination (Raven *et al.*, 1999) (figure 9). Encore une fois, la vacuolisation joue un rôle majeur dans la dégradation des réserves et des organelles, qui semblent être hydrolysées par des voies autophagiques distinctes mais non mutuellement exclusives : l'une origine du RE et du Golgi et implique des vésicules contenant des cystéine protéinases et l' α -amylase qui fusionnent aux vacuoles de réserve et les transforment en vacuoles lytiques; l'autre implique des membranes qui englobent des parties de cytoplasme (autophagosomes), contenant entre autres des mitochondries, qui fusionnent; les deux voies se rejoignent lors de l'incorporation de toutes ces vacuoles à une grande vacuole lytique (Toyooka *et al.*, 2001).

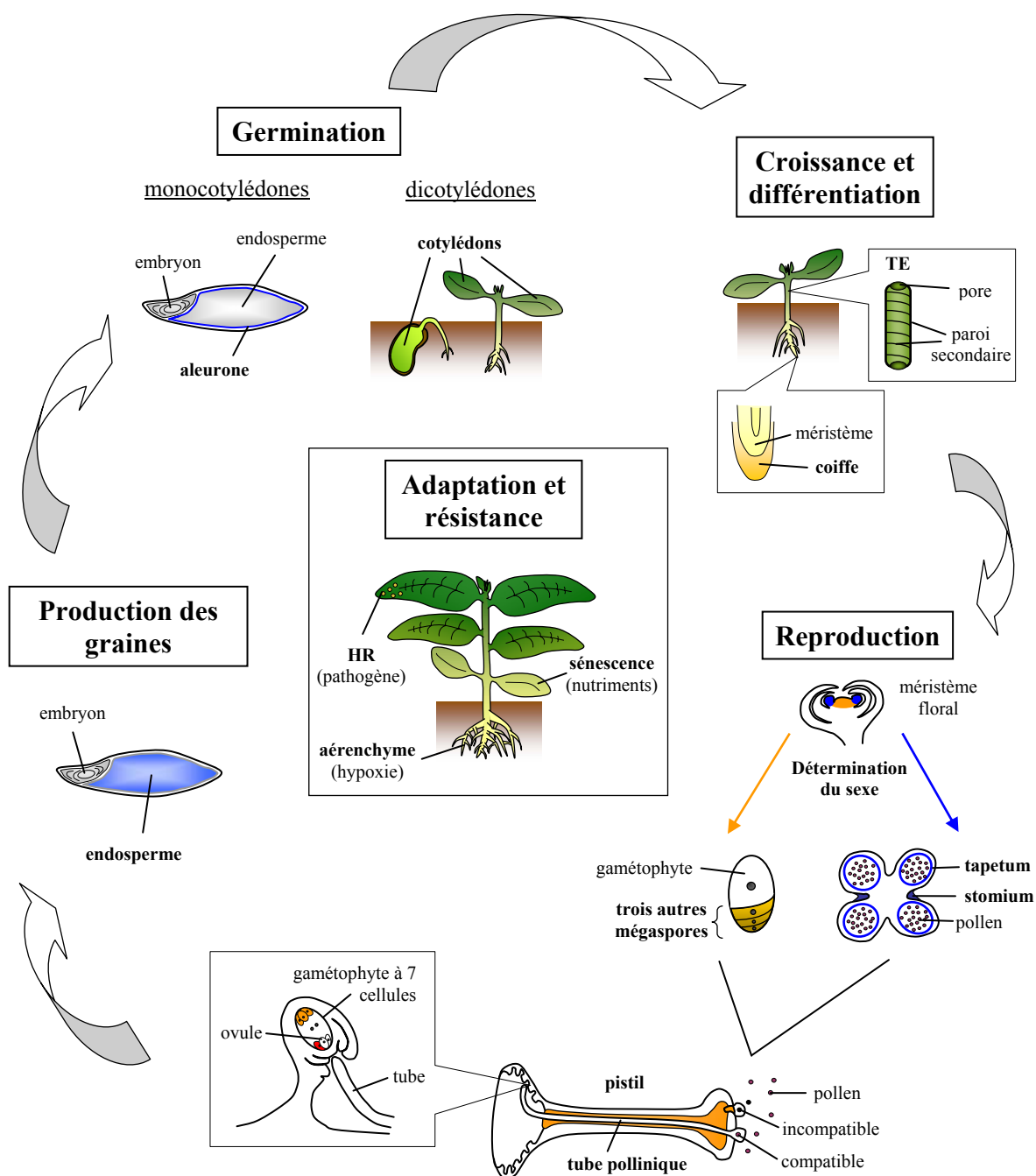


Figure 9 La PCD dans la vie des angiospermes. Lors de la germination, l'aleurone (en bleu) ou les cotylédons fournissent l'énergie nécessaire. Les TE (pour le transport de l'eau des racines aux feuilles) et la coiffe des racines (protection contre l'abrasion) sont des structures différenciées faites de cellules mortes. Le méristème apical floral peut donner naissance aux primordia des étamines (mâles, région bleue) et du carpelle (femelle, zone orange); chez les espèces à fleurs unisexuelles comme le maïs, une des deux régions meurt pour produire l'organe de l'autre sexe. Chez la femelle (flèche orange), une mégaspore haploïde formera le gamétophyte, les trois autres meurent. Dans les anthères (mâle, flèche bleue), le tapetum dégénère pour compléter la formation du pollen et la mort du stomium le disperse. Au cours de la pollinisation, l'arrivée sur le pistil d'un pollen incompatible provoque la mort du tube pollinique, alors qu'un pollen compatible provoque la croissance du tube, facilitée par la mort des tissus avoisinants (orange). Le tube pollinique entre dans l'ovule grâce à l'ouverture faite par la mort d'une des deux cellules qui l'entoure (rouge); suite à la fécondation, les cellules à l'opposé (orange) meurent aussi. La production de la graine implique la PCD massive de cellules de l'endosperme. Tout au long de leur vie (encadré du centre), les plantes utilisent aussi la PCD pour résister aux pathogènes ou s'adapter au manque de nutriments ou d'oxygène. (Les schémas des structures reproductives ont été inspirés de Wu et Cheung, 2000.)

Les phénomènes de croissance et de différenciation des tissus présentent également plusieurs cas de PCD bien connus. Par exemple, l'extrémité apicale des racines est munie d'une coiffe de cellules mortes continuellement renouvelée qui protège le méristème sous-jacent de l'abrasion lors de la croissance (figure 9). Lors de la PCD des cellules de la coiffe, leurs noyaux se condensent et leur ADN est clivé (Wang *et al.*, 1996). Mais l'exemple sans doute le mieux caractérisé est rencontré lors de la différenciation des éléments conducteurs (TE, *tracheary elements*), qui forment les éléments de vaisseaux et les trachéides des plantes vasculaires comme *Zinnia* (revue de Fukuda, 2000). Les TE sont en fait des cellules mortes et vides (il ne reste que la paroi) en forme de tubes (figure 9) servant au transport de l'eau dans le xylème. La différenciation du procambium en TE s'accompagne d'un renforcement caractéristique de la paroi (essentiel pour supporter les pressions très élevées nécessaires pour amener l'eau des racines aux feuilles) et est caractérisée par l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule, la vacuolisation et l'accumulation de nucléases et de protéases puis culmine avec l'éclatement de la vacuole qui libère les enzymes hydrolytiques qui dégradent le contenu de la cellule, ne laissant qu'un tube vide (Groover et Jones, 1997; Fukuda, 2000; aussi intéressant, les films réalisés par l'équipe de Jones et disponibles à <http://www.bio.unc.edu/faculty/jones/lab/pcd/>).

La reproduction implique aussi de très nombreux cas de PCD (revues de Wu et Cheung, 2000) (figure 9). Par exemple, la PCD est majeure dans la détermination du sexe. La plupart des angiospermes sont hermaphrodites mais certaines espèces ont un seul sexe par plante. Certaines, comme le maïs, ont les deux sexes sur la même plante, mais les organes sont sur des fleurs séparées. Au cours du développement des fleurs, le méristème apical peut donner naissance aux primordia des organes des deux sexes et l'unisexualité de la fleur est accomplie en éliminant l'un des deux sexes. Dans les anthères, la production de grains de pollen fonctionnels et leur dispersion reposent sur la PCD du tapetum et du stomium, respectivement. La mort du tapetum, qui entoure les sacs à pollen, a pour fonction de terminer de sculpter la surface du pollen et de le recouvrir de molécules d'adhésion et de signalisation de nature protéique et lipidique critiques pour l'interaction avec le pistil lors de la pollinisation. La PCD du stomium ouvre les sacs polliniques, permettant la dispersion du pollen. Chez les organes femelles, des cellules meurent pour former le conduit du tube pollinique ainsi que lors du développement du gamétophyte et du sac embryonnaire

contenant l'ovule. Lorsqu'un pollen incompatible arrive, le tube pollinique meurt et empêche la rencontre avec l'ovule par un mécanisme qui implique l'ubiquitine et donc probablement le protéasome (Stone *et al.*, 2003 et la revue de Newbiggin et Vierstra, 2003). Un pollen compatible, par contre, provoque la croissance du tube pollinique et son passage est facilité par la PCD de cellules avoisinantes. Le tube pollinique croissant pénètre aussi dans l'ovule par un passage ouvert par la mort d'une cellule bien précise qui l'entoure. Après la fertilisation, d'autres cellules autour de l'ovule meurent aussi et les pétales de la fleur, qui ne sont plus utiles (pour attirer les insectes pollinisateurs), entrent en sénescence (revu par Rubinstein, 2000). Avec autant de cas de PCD impliqués dans le développement des organes reproducteurs et dans le processus de fertilisation lui-même, il n'est pas surprenant de constater que des défauts affectant la PCD à ce niveau conduisent généralement à des anomalies considérables allant jusqu'à la stérilité.

La production des graines nécessite aussi la mort de plusieurs tissus, mais le cas le plus étudié est celui de l'endosperme des céréales (revu par Young et Gallie, 2000). La couche externe de l'endosperme, l'aleurone, meurt seulement au moment de la germination mais le reste du tissu meurt lors de la formation de la graine (figure 9). La fragmentation internucléosomale de l'ADN est observée dans ce cas de PCD. L'éthylène joue un rôle clé dans le déclenchement du programme de mort de l'endosperme et l'acide abscisique influence négativement le processus, en interférant avec la biosynthèse de l'éthylène mais aussi possiblement en diminuant la sensibilité à cette phytohormone (Young et Gallie, 2000). Par ailleurs, la formation des graines est un processus très énergivore (comme par exemple pour y emmagasiner des réserves et en retirer presque toute l'eau) et beaucoup de plantes s'y sacrifient en y allouant toutes leurs ressources.

1.3.1.2 Adaptation à l'environnement et résistance aux pathogènes

Si, pour plusieurs plantes, la vie se termine avec la production des graines, la sénescence est aussi importante tout au long de la vie (voir Quirino *et al.*, 2000; Lee et Chen, 2002; Yoshida, 2003). À mesure que les feuilles vieillissent, elles deviennent de moins en moins efficaces à faire la photosynthèse et enclenchent un processus lent de démantèlement cellulaire et de translocation des nutriments vers les parties plus jeunes ou les organes reproducteurs, qui demandent beaucoup d'énergie. Ce processus est caractérisé par une

perte de chlorophylle (reflété par le jaunissement) qui culmine avec le dessèchement complet et souvent l'abscission de la feuille. L'éthylène est reconnu pour accélérer la sénescence et les cytokinines pour la retarder. À l'échelle cellulaire, la sénescence est caractérisée par l'importance des vacuoles dans la digestion des organelles (les chloroplastes disparaissent en premier, les mitochondries et le noyau en dernier) (Quirino *et al.*, 2000). Le processus de sénescence peut être devancé par le manque de nutriments (comme l'azote ou le carbone), aussi associé à l'autophagie chez des cultures cellulaires de plantes (Aubert *et al.*, 1996; Moriyasu et Ohsumi, 1996) et de levures (voir Kim et Klionsky, 2000; Abeliovich et Klionsky, 2001).

Dernièrement, un lien intéressant entre l'autophagie, le recyclage des nutriments et la sénescence a été établi au niveau moléculaire de manière similaire par deux équipes (Doelling *et al.*, 2002; Hanaoka *et al.*, 2002). Les sentiers impliqués dans l'autophagie chez la levure sont maintenant relativement bien connus (revu par Abeliovich et Klionsky, 2001; Stromhaug et Klionsky, 2001) et au moins 25 gènes d'*Arabidopsis* homologues à une douzaine de gènes *APG* (parmi les quinze) essentiels à l'autophagie des levures ont été trouvés (Hanaoka *et al.*, 2002), de même que des homologues de tous les composants nécessaires à l'un des sentiers autophagiques chez la levure (Doelling *et al.*, 2002). Des mutants d'*Arabidopsis* sans *AtAPG7* ou *AtAPG9* entrent en sénescence plus rapidement et produisent beaucoup moins de graines que le type sauvage, un effet encore plus prononcé lorsque les nutriments (carbone et azote) sont rares (Doelling *et al.*, 2002; Hanaoka *et al.*, 2002). Des feuilles détachées de plantes sauvages et conservées sur un milieu sans carbone ni azote pendant plus de 30 jours se remettent à pousser lorsqu'on les transfère en milieu riche, alors que les feuilles de la lignée sans *AtAPG7* sont presque toutes mortes après deux semaines sur le milieu pauvre (Doelling *et al.*, 2002). Morphologiquement, la mort des cellules de l'épiderme des feuilles détachées du mutant d'*AtAPG9* est caractérisée par la vacuolisation (Hanaoka *et al.*, 2002). Par contre, les vacuoles de protoplastes isolées de jeunes feuilles du mutant d'*AtAPG7* semblent normales (Doelling *et al.*, 2002), possiblement parce que ces cellules n'avaient pas encore amorcé le programme de sénescence, qui progresse de façon caractéristique des plus vieilles feuilles vers les plus jeunes. Prises ensemble, ces données démontrent la conservation chez les plantes de sentiers autophagiques impliqués dans le recyclage des nutriments, un processus de mort

qui devient primordial pour la survie de la plante et de l'espèce en conditions nutritives pauvres.

Chez les animaux, la PCD de type autophagique a aussi été associée à plusieurs situations dans le développement normal et à la réponse au manque de nutriments, de même qu'à plusieurs pathologies chez l'humain (voir Bursch *et al.*, 2000; Klionsky et Emr, 2000). Des sentiers d'autophagie homologues à ceux des levures sont présents chez les animaux (revu par Kim et Klionsky, 2000; Klionsky et Emr, 2000), dont certains impliquent des homologues aux protéines APG. Pour n'en mentionner que quelques uns, l'homologue humain d'APG5 (hAPG5) a été identifié en tant que « protéine spécifique à l'apoptose » puisque qu'elle est produite suite à l'induction de l'apoptose (Hammond *et al.*, 1998); un autre homologue, hAPG12, a été trouvé associé de manière covalente à hAPG5 (Mizushima *et al.*, 1998). De plus, hAPG3 active directement trois homologues humains d'APG8, un effet favorisé par la surexpression d'hAPG7; de plus, hAPG3 co-immunoprécipite avec hAPG7 et hAPG12, en plus de faciliter l'association entre hAPG8 et hAPG5 (Tanida *et al.*, 2002). Mais le plus intéressant est sans doute l'homologue humain d'APG6, nommé Beclin 1, qui lie et inhibe l'activité de Bcl-2, et qui est plus faiblement exprimé dans certains cancers et empêche la formation induite de tumeurs chez des souris; Beclin 1 rétablit aussi la capacité à l'autophagie chez des levures déficientes en APG6 (Liang *et al.*, 1999). La conservation structurelle et fonctionnelle extensive des régulateurs de l'autophagie entre les levures, les animaux et maintenant les plantes suggère que cette forme de mort implique des sentiers évolutivement très anciens, aux fonctions primordiales pour tous les eucaryotes. Cependant, notre conception de l'autophagie, de ses rôles physiologiques, de ses mécanismes et leur régulation ainsi que des implications évolutives qui en découlent sont encore, elles aussi, primitives. La recherche à venir dans ce domaine semble donc s'annoncer très excitante.

L'adaptation des plantes aux conditions environnementales difficiles fournit encore d'autres modèles classiques de PCD. Par exemple, lorsque les racines manquent d'oxygène, comme lorsque le sol est inondé, les plantes survivent en déclenchant la formation de l'aérenchyme (revu par Drew *et al.*, 2000), un tissu poreux dont la fonction est de faciliter le transport de l'oxygène de la tige aux cellules des racine. La formation de l'aérenchyme

implique la mort orchestrée de cellules bien précises, ce qui donne naissance aux cavités (figure 10A) facilitant les échanges gazeux tout en réduisant le nombre de cellules demandant de l'oxygène. L'hypoxie augmente la production d'éthylène, qui déclenche la formation de l'aérenchyme; au niveau cellulaire, la mort passe par une augmentation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique et la vacuolisation. Par ailleurs, la PCD induite par différents stress de l'environnement a aussi été étudiée à l'aide de cellules en culture. Les UV (Danon et Gallois, 1998), le H_2O_2 (McCabe *et al.*, 1997; Desikan *et al.*, 1998; O'Brien *et al.*, 1998), un choc thermique (McCabe *et al.*, 1997), le froid (Koukalová *et al.*, 1997) ou un calcium ionophore (McCabe *et al.*, 1997; O'Brien *et al.*, 1998) provoquent la mort régulée de cultures de cellules de différentes espèces.

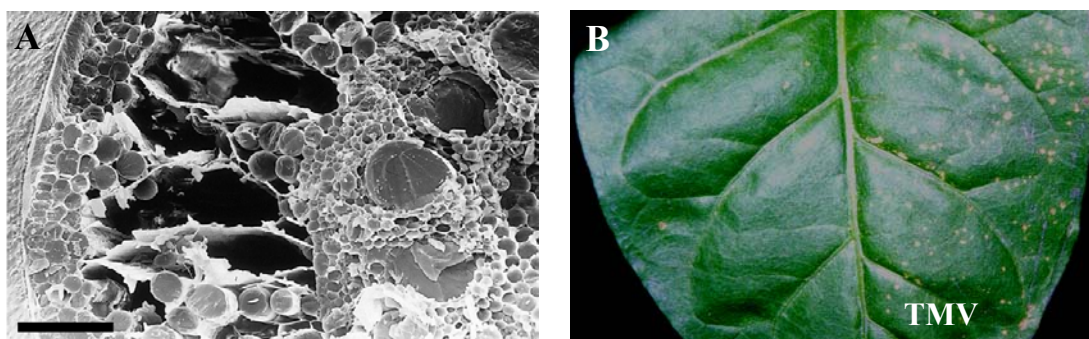


Figure 10 Adaptation à l'environnement et PCD. (A) Formation de l'aérenchyme. Dans les racines en hypoxie, certaines cellules meurent pour former des cavités (grandes zones noires) facilitant l'apport d'oxygène aux cellules restantes. (La barre vaut 0,1 mm; micrographie électronique à balayage d'une coupe transversale de racine de maïs tirée de Drew *et al.*, 2000). (B) Réponse hypersensible (HR). Suite à l'inoculation du TMV (côté droit), le tabac possédant le gène de résistance *N* (ici cv Xanthi, génotype *NN*) développe de petites zones de cellules mortes autour du site d'infection, ce qui empêche la propagation du virus (photo par Nathalie Bolduc).

Mais l'un des cas de PCD les plus étudiés chez les végétaux est la réponse hypersensible (HR, *hypersensitive response*) (revu par Heath, 2000; Lam *et al.*, 2001), qui survient chez les plantes résistantes à un pathogène viral, bactérien ou fongique. Les plantes possédant un gène de résistance *R* approprié développent des zones de quelques cellules mortes aux sites d'attaque d'un pathogène, restreignant ainsi sa propagation. La résistance dépend d'une interaction de type « gène pour gène » entre le gène *R* de la plante et un gène d'« avirulence » (*avr* chez les pathogènes bactériens ou fongiques). Par exemple, chez le tabac portant le gène de résistance *N*, la HR causée par le virus de la mosaïque du tabac

(TMV) (figure 10B) implique la reconnaissance de la réplicase du virus par la plante (Erickson *et al.*, 1999; Dinesh-Kumar *et al.*, 2000). Ce système est particulièrement intéressant étant donné la facilité avec laquelle on peut obtenir un très grand nombre de cellules en HR simultanément : à 32°C, la HR n'est pas déclenchée et permet la réplication du TMV; le transfert à 22°C rétablit la capacité à la HR, qui se traduit par une mort massive dans les heures qui suivent. La HR déclenche parallèlement l'activation de mécanismes de défense moins spécifiques, comme ceux qui passent par l'acide salicylique (revu par Alvarez, 2000) ou les ROS (revu par Delledonne *et al.*, 2002; Hancock *et al.*, 2002; Vranová *et al.*, 2002), qui rendent plus efficace la réponse à des attaques subséquentes. Par ailleurs, la HR est une forme de PCD qui semble un peu particulière (voir Heath, 2000; Jones, 2001), comme le suggèrent certaines caractéristiques qui diffèrent quelque peu de celles généralement rencontrées dans la différenciation. Dans un premier temps, la mort par HR se doit d'être très rapide, au détriment du recyclage des nutriments (contrairement à la mort très lente lors de la sénescence); ainsi les organelles ne sont généralement pas digérées. Le cytoplasme se condense et les cellules deviennent autofluorescentes puis brunes, vraisemblablement à cause de l'accumulation et de l'oxydation de composés phénoliques. Les « cadavres » des cellules ayant subi la HR ne disparaissent pas (comme par exemple lors de la formation de l'aérenchyme), mais sont plutôt simplement écrasés par l'expansion des cellules avoisinantes. Ainsi, si les plantes ne possèdent pas de système immunitaire sophistiqué comme les animaux, elles ont quand même développé des mécanismes de défense tout aussi subtils et efficaces (voir la section spéciale *Nature Insight : Plant defence* dans Nature 411, p.825-868, 2001) parmi lesquels la HR est majeure.

La PCD est donc notoire dans pratiquement tous les aspects de la physiologie des plantes et les modifications morphologiques et biochimiques qui y sont associées sont maintenant relativement bien connues. Mais les mécanismes moléculaires de la mort cellulaire chez les végétaux sont encore plus ou moins bien compris.

1.3.2 Effecteurs de la mort

1.3.2.1 Activité caspase et les métacaspases

Chez les végétaux, le démantèlement cellulaire implique l'activation d'une panoplie de protéases. Étant donné l'importance des caspases dans l'apoptose animale, il n'est pas étonnant que beaucoup d'efforts aient été consacrés à la recherche d'homologues structurels et fonctionnels de ces protéases chez les plantes. La disponibilité de génomes de plantes n'a pas permis de trouver d'homologues de séquence des caspases selon les critères classiques chez les animaux, mais plusieurs arguments en faveur d'une « vraie activité caspase » jouant un rôle crucial dans la PCD chez les végétaux existent (revus par Lam et del Pozo, 2000; Woltering *et al.*, 2002).

Premièrement, différents inhibiteurs et substrats synthétiques plus ou moins spécifiques aux caspases des mammifères sont reconnus par des protéases associées à la PCD chez les végétaux. Ces inhibiteurs peuvent interférer avec le déroulement normal de la mort programmée dans différents modèles. Des macromolécules naturelles ont aussi été utilisées pour étudier l'activité caspase chez les plantes. La poly-(ADP-ribose) polymérase (PARP), impliquée dans la réparation de l'ADN chez les animaux, semble bien conservée structurellement et fonctionnellement entre les animaux et les plantes. Son clivage par la caspase-3 est un marqueur moléculaire de l'apoptose animale très utilisé. Plusieurs cas où la PARP est clivée par des protéases végétales, possiblement à un site de reconnaissance des caspases, ont été rapportés (Lam et del Pozo, 2000). De plus, des inhibiteurs naturels des caspases, comme les IAP viraux et notamment p35 du baculovirus, inhibent la PCD dans des systèmes végétaux. p35 présente un intérêt particulier puisqu'il inhibe pratiquement toutes les caspases, mais n'interagit pas avec d'autres protéases (même celles avec un repliement semblable au « caspase-hémoglobine » typique). Des mutants de p35 fonctionnellement handicapés ne parviennent pas, contrairement à la protéine fonctionnelle, à diminuer la HR chez des lignées transgéniques de tabac résistants attaqués par le TMV (Lam et del Pozo, 2000). Mais des protéines avec une activité similaire aux caspases impliquées dans ces processus chez les végétaux n'ont pas encore été identifiées.

Par ailleurs, les métacaspases sont considérées par plusieurs comme des candidats potentiels à l'exécution de la PCD chez les plantes. Les métacaspases sont divisées en deux

classes relativement bien définies. Le type I est caractérisé par un prodomaine contenant un motif répété riche en proline. Plusieurs métacaspases de type I végétales possèdent aussi dans leur prodomaine des motifs « doigt de zinc » ressemblant à ceux de la protéine LSD-1, un inhibiteur de la HR agissant possiblement comme facteur de transcription (Dietrich *et al.*, 1997; Uren *et al.*, 2000). Les métacaspases de type II, retrouvées seulement chez les plantes, ne contiennent pas de prodomaine mais plutôt une extension C-terminale d'environ 200 acides aminés. La modélisation de la structure tridimensionnelle des métacaspases démontre une similarité significative à celle des caspases (principalement le repliement « caspase-hémoglobine »). Les caspases et les métacaspases appartiennent à une superfamille de protéases avec certaines similarités structurales (malgré une faible homologie de séquence) incluant les hémoglobines, la gingipaïne bactérienne et légumaines. Les légumaines, des cystéine protéinases présentes chez les humains et les plantes, ont une spécificité stricte pour un résidu Asn (et non un Asp) immédiatement en N-terminal du site de clivage de leur substrat et ont un repliement similaire aux caspases (Chen *et al.*, 1998).

Par contre, les premières données sur la fonction des métacaspases d'eucaryotes unicellulaires (Madeo *et al.*, 2002; Szallies *et al.*, 2002 ; voir la section 1.2.4) suggèrent un rôle dans la régulation de la mort. Leur implication dans l'exécution de la PCD n'est pas exclue (et même souvent proposée ou assumée ; voir par exemple Madeo *et al.*, 2002), mais n'a pas encore été démontrée de manière convaincante. À ma connaissance, aucune donnée fonctionnelle sur les intrigantes métacaspases végétales (notamment celles du type II) n'a encore été publiée, mais on peut supposer qu'elles pourraient fonctionner différemment des caspases. Ce qui implique qu'il faudra sans doute imaginer, pour comprendre les fonctions des métacaspases, des modèles différents de ceux utilisés dans l'étude des caspases animales.

1.3.2.2 Autres protéases

Plusieurs autres classes de protéases ont été associées à la PCD végétale et semblent pour l'instant de meilleurs candidats au démantèlement de la cellule, mais leurs rôles précis sont loin d'être compris (revu par Beers *et al.*, 2000).

Premièrement, des cystéine protéases (autres que celles dont il a été discuté à la section précédente) ont été associées à différents cas de PCD chez les végétaux. Notons ici la famille bien connue de la papaïne (voir Beers *et al.*, 2000) et les phytocalpaïnes, des homologues aux calpaïnes animales (des cystéine protéases dépendantes du calcium) récemment identifiées. La première phytocalpaïne a été clonée grâce au mutant *dek1* (pour *defective kernel*) du maïs, qui présente des défauts dans la différenciation de l'endosperme (Lid *et al.*, 2002). Des phytocalpaïnes ont aussi été trouvées chez plusieurs plantes différentes, incluant des angiospermes et des gymnospermes; mais à ce jour, une seule phytocalpaïne a été trouvée pour chacune (Lid *et al.*, 2002; Margis et Margis-Pinheiro, 2003). Les phytocalpaïnes sont particulièrement intéressantes étant donné l'implication des calpaïnes animales dans l'apoptose et l'importance du Ca^{2+} dans la signalisation de la mort chez les deux règnes.

Ensuite, des sérine protéases ont aussi été impliquées dans plusieurs modèles de PCD végétale (voir Beers *et al.*, 2000). Parmi celles-ci se trouvent des enzymes avec une activité similaire à celle de la trypsine et la superfamille des subtilisines, qui contient de nombreux membres chez *Arabidopsis* et *Lycopersicon* et plusieurs autres genres végétaux. La sérine protéase animale Omi/Htr2A, libérée de l'espace intermembranaire des mitochondries, est évolutivement très ancienne et quelques homologues de séquence ont été trouvés chez les plantes (Koonin et Aravind, 2002), quoique leur fonction n'a pas été vérifiée. Par ailleurs, les seules aspartate protéases associées à la PCD chez les végétaux sont les phytepsines, retrouvées chez *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana* et *Brassica* sp. Elles sont synthétisées sous forme de prépropeptides très similaires à des aspartate protéases bactériennes et à la cathepsine D, qui est associée à plusieurs exemples de mort programmée chez les animaux (voir Beers *et al.*, 2000). Le protéasome, classé comme thréonine protéase, est maintenant reconnu pour son rôle dans la régulation et l'exécution de la PCD animale. Chez les plantes, plusieurs travaux ont aussi associé plus ou moins directement la régulation de la PCD au système ubiquitine-protéasome (voir Beers *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2003; Newbiggin et Vierstra, 2003; Vierstra, 2003), mais les mécanismes impliqués et leurs rôles physiologiques ne sont pas encore clairs. Finalement, considérant leur rôle dans l'apoptose animale, les métalloprotéinases constituent une dernière classe de

protéases possiblement impliquées dans la PCD végétale (Beers *et al.*, 2000), mais cette hypothèse n'a pas été vérifiée.

1.3.2.3 Nucléases

La dégradation du matériel génétique apparaît, philosophiquement, comme un signe majeur d'un suicide cellulaire. Ainsi, l'activation de nucléases et la digestion de l'ADNg sont des caractéristiques classiques de la PCD, mais encore peu de données directes sont disponibles sur des effecteurs et les mécanismes impliqués. Les endonucléases dépendantes du Zn^{2+} et du Ca^{2+} constituent deux classes majeures de DNAses végétales, et plusieurs d'entre elles voient leur expression majorée lors de différents cas de PCD (revu par Sugiyama *et al.*, 2000). Notons ici les homologues BEN1 et ZEN1, qui dépendent du Zn^{2+} et qui ont été clonés chez *Hordeum* et *Zinnia*, respectivement; d'autres homologues végétaux de ces protéines ont aussi été retrouvés dans les banques de données. Récemment, il a été proposé que ZEN1, parmi d'autres DNAses, pourrait bien occuper un rôle central dans la fragmentation de l'ADN lors de la différenciation des TE (Ito et Fukuda, 2002). Il sera intéressant de voir si c'est aussi le cas dans d'autres modèles de PCD.

Par ailleurs, l'endonucléase G et l'AIF sont relâchées de l'espace intermembranaire des mitochondries chez les animaux et entraînent alors la dégradation de l'ADN, indépendamment des caspases. Ces protéines sont conservées chez les végétaux et pourraient s'avérer être des candidats intéressants. Supportant cette idée, une étude parue récemment démontre, à l'aide d'un système acellulaire, deux types d'activité DNase nécessitant le Mg^{2+} dans l'espace intermembranaire des mitochondries (Balk *et al.*, 2003). La première génère rapidement de gros fragments d'environ 30 kpb et ensuite la condensation de la chromatine; la seconde est beaucoup plus longue à se manifester, en plus de nécessiter la contribution d'un facteur cytosolique, et provoque la fragmentation internucléosomale de l'ADN. Ces caractéristiques rappellent celles des AIF et endonucléase G des animaux (Balk *et al.*, 2003 et la section 1.2.4), en plus de supporter l'idée que, comme chez les animaux, la fragmentation de l'ADN se produit en deux étapes. Par contre, les fonctions des homologues végétaux de ces protéines n'ont pas encore été étudiées directement.

1.3.3 Signalisation, régulation et régulateurs

Si, chez les animaux, on commence à avoir une bonne idée des sentiers, des régulateurs et des mécanismes impliqués dans l'apoptose, le tableau n'est pas aussi clair chez les plantes. La recherche de similarités avec l'apoptose a permis de tirer plusieurs parallèles (parfois surprenants) au niveau des sentiers de signalisation, mais la récolte d'homologues des régulateurs animaux s'est avérée pauvre. Les particularités des plantes ont aussi été exploitées : les fonctions des phytohormones commencent à être mieux comprises et plusieurs mutants avec des défauts de régulation de la PCD ont été caractérisés.

1.3.3.1 Signaux et sentiers de mort

Les phytohormones influencent et contrôlent pratiquement tous les aspects de la physiologie végétale, incluant la PCD (voir Raven *et al.*, 1999; Hoeberichts et Woltering, 2002). La réponse aux différentes phytohormones est complexe et varie d'un type cellulaire à l'autre, notamment à cause de sensibilités différentes à chacune. Il est connu depuis longtemps que l'éthylène favorise la sénescence, le mûrissement, la maturation de l'endosperme, l'abscission et la différenciation de l'aérenchyme. Les cytokinines peuvent diminuer l'effet de l'éthylène sur la sénescence. La mort de l'aleurone lors de la germination représente aussi un cas bien connu de contrôle hormonal de la PCD : l'acide gibbérellique la favorise alors que l'acide abscisique la retarde. Par ailleurs, l'acide salicylique (AS), un composé phénolique, semble jouer un rôle majeur dans les mécanismes de défense des plantes (voir les revues d'Alvarez, 2000 et Hoeberichts et Woltering, 2002). Lors de l'attaque par le TMV chez le tabac, l'AS s'accumule en gradient décroissant à partir de la lésion, ce qui suggère qu'une haute concentration d'AS stimule la mort alors qu'une plus faible semble protéger de la mort les cellules plus éloignées. L'AS peut déclencher la production de ROS et inversement (l'oxydation des composés phénoliques accompagne souvent la mort), en plus d'activer au moins une MAPK. Finalement, l'acide jasmonique, une molécule volatile, a aussi été associé à l'activation des mécanismes de défense (dont la HR) et peut même agir sur les plantes avoisinantes, comme pour les avertir de se préparer au danger. Mais les mécanismes moléculaires impliqués dans régulation de la PCD par les phytohormones sont encore obscurs.

Par ailleurs, les produits des gènes *R* sont aussi présumés être en amont de plusieurs sentiers de mort (Shirasu et Schulze-Lefert, 2000). Au cours la dernière décennie, le clonage et la caractérisation de gènes *R* ainsi que la disponibilité de génomes de plantes, ont permis de révéler leur structure générale étonnamment conservée, étant donnée la diversité des pathogènes qu'ils reconnaissent (figure 11) (revu par Shirasu et Schulze-Lefert, 2000; Dangl et Jones, 2001). La plus grande des familles de gènes *R*, nommée NB-LRR, code pour des protéines généralement cytoplasmiques composées d'un domaine de liaison de nucléotide (NB, *nucléotide binding*) et d'un domaine contenant des répétitions riches en leucine (LRR, *leucine-rich repeats*). Fait intéressant, des motifs (qui comprennent le NB) chez des membres de la famille des NB-LRR présentent des similarités avec Apaf-1 (mammifères) et CED-4 (*C. elegans*); cette région élargie est nommée domaine AP-ATPase et est aussi retrouvée chez plusieurs procaryotes, ce qui suggère une origine évolutive ancienne (Aravind *et al.*, 1999; Shirasu et Schulze-Lefert, 2000; Dangl et Jones, 2001; Koonin et Aravind, 2002). Le génome d'*Arabidopsis* contient ~150 séquences avec une homologie aux NB-LRR dans une centaine de loci répartis sur tous les chromosomes. La famille des NB-LRR est divisée en deux classes, selon leur extrémité N-terminale. Celle contenant le plus de membres (~60%) possède un domaine similaire aux domaines cytoplasmiques des récepteurs Toll et interleukine-1 (TIR) de la drosophile et des mammifères; de plus les TIR-NB-LRR ressemblent structurellement et fonctionnellement aux TLR (*Toll-like receptor*) impliqués dans l'immunité innée des mammifères et de la drosophile (voir Dangl et Jones, 2001). La deuxième classe possède un domaine N-terminal ayant la capacité de former une structure superenroulée (CC, *coiled-coil*) qui présente certaines similarités avec un motif « leucine-zipper » et est appelée CC-NB-LRR ou LZ-NB-LRR.

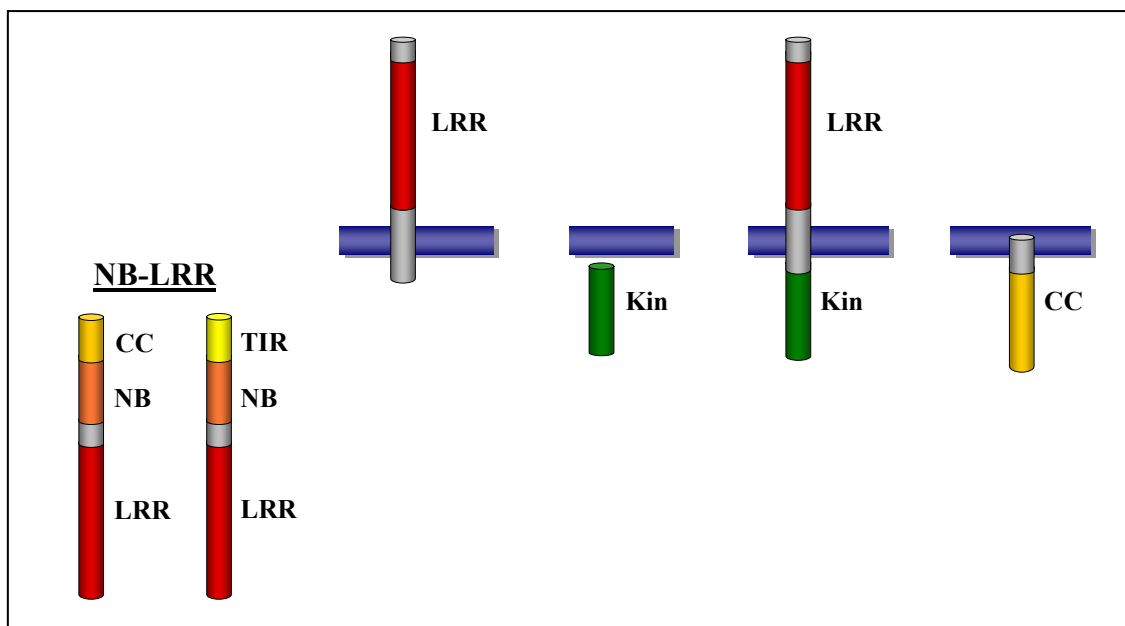


Figure 11 Structure et localisation des principales familles des produits des gènes R.

Les NB-LRR sont cytoplasmiques alors que les représentants des quatre autres groupes sont associés à la membrane plasmique. Voir le texte pour les détails. CC, coiled-coil; Kin, kinase; LRR, leucine-rich repeats; NB, nucleotide binding; TIR, Toll/interleukin-1 receptor. (Figure inspirée de celle de Dangl et Jones, 2001).

Les quatre autres familles de produits des gènes R sont membranaires et structurellement plus diversifiées (Shirasu et Schulze-Lefert, 2000; Dangl et Jones, 2001). Plusieurs des produits des gènes de résistance *Cf* de la tomate contiennent une hélice membranaire unique et un LRR extracellulaire. Le *Pto* de la tomate est le prototype d'une troisième classe qui code pour un domaine sérine-thréonine kinase cytoplasmique. *Pto* interagit directement avec son partenaire issu de *Pseudomonas syringae*, *AvrPto*, mais son activité nécessite *Prf*, une protéine NB-LRR. Une autre classe a initialement été identifiée chez le riz et possède, en plus d'un domaine sérine-thréonine kinase cytoplasmique, une hélice transmembranaire et un grand domaine LRR extracellulaire. Enfin, la dernière classe provient de l'identification de *RPW8* d'*Arabidopsis*, qui code pour un domaine d'ancrage membranaire et un CC cytoplasmique. La spécificité des produits des gènes R semble venir

du domaine LRR, dont les régions exposées au solvant sont hypervariables, ce qui rappelle encore le système immunitaire animal.

Par ailleurs, les MAPK végétales sont primordiales dans la transduction des signaux induits par plusieurs stress, et ressemblent aussi à la JNK animale (revu par Zhang et Klessig, 2001). Des pathogènes (*via* les produits de gènes *R* ou d'éliciteurs non-spécifiques) ou des stress abiotiques comme l'hypoxie, les ROS, les UV, les blessures ou les températures extrêmes, induisent des cascades de kinases chez les plantes. Ces cascades aboutissent à l'activation de facteurs de transcription et de gènes de défense, au déclenchement de la HR ou à la synthèse de phytohormones (comme l'acide jasmonique et l'acide salicylique) qui peuvent avoir un effet rétroamplificateur. Mais beaucoup d'intermédiaires dans ces cascades de phosphorylation n'ont pas encore été identifiés, tout comme les récepteurs qui les activent et leurs cibles exactes.

Les ROS sont aussi reconnus comme des éléments importants de la signalisation dans plusieurs modèles de PCD chez les plantes (revu par Rao *et al.*, 2000; Delledonne *et al.*, 2002; Fath *et al.*, 2002; Hancock *et al.*, 2002; Neill *et al.*, 2002a; Neill *et al.*, 2002b; Vranová *et al.*, 2002) et ont beaucoup été étudiés dans le cadre de la HR et chez des cellules en culture. En temps normal, plusieurs mécanismes cellulaires limitent l'accumulation accidentelle et les effets nocifs des ROS. Mais toute une gamme de stress biotiques ou abiotiques provoque l'augmentation de la production de H₂O₂. L'exposition au H₂O₂ provoque différentes réponses cellulaires, dont l'activation de MAPK, l'augmentation ou la répression de la transcription de plusieurs gènes, l'entrée de Ca²⁺ dans la cellule, l'augmentation de la production de NO ainsi que l'accumulation d'acide salicylique et d'éthylène. Ces effets semblent liés à la production de NO et dépendent de la dose - une faible concentration induit des enzymes antioxydantes; une grande mène à la mort. Par contre, les mécanismes impliqués ne sont pas clairs. Les ROS peuvent être produits lors du découplage des chaînes de transport des électrons de la respiration et de la photosynthèse, respectivement dans les mitochondries et les chloroplastes, et lors de la photorespiration dans les peroxisomes. Par analogie au système animal, le relâchement du cytochrome *c* est observé dans plusieurs cas de PCD végétale (mais pas pendant la HR); mais on ignore encore si cet événement est significatif dans l'activation de sentiers d'exécution similaire à

la formation de l'apoptosome. Dernièrement, le lien entre la mitochondrie, le H_2O_2 et la PCD a été clarifié. Chez des cellules d'*Arabidopsis* en culture, l'exposition brève à une haute concentration de H_2O_2 ou plus prolongée à une faible concentration cause une production accrue de H_2O_2 via une accélération de la chaîne respiratoire, et résulte en l'épuisement de l'ATP, l'ouverture du PTP et finalement la mort (Tiwari *et al.*, 2002). Les ROS et la mitochondrie, comme chez les animaux, semblent donc jouer un rôle important dans la signalisation, l'intégration et l'amplification des signaux de mort. Mais leur rôle chez les végétaux n'est pas clair et plusieurs points fondamentaux demeurent controversés.

Le Ca^{2+} est aussi un messenger reconnu de la PCD végétale. Une élévation du Ca^{2+} cytosolique a été observée dans la différenciation des TE, la formation de l'aérenchyme, la maturation de l'endosperme et la HR; les ROS provoquent aussi cet effet dans plusieurs modèles, mais pas dans d'autres (comme la formation des TE; Fukuda, 2000). Le rôle du Ca^{2+} dans la différenciation des TE est étudié depuis relativement longtemps et un modèle proposé du déroulement de ce processus nécessite l'entrée massive de Ca^{2+} dans la cellule pour initier les événements associés à la PCD (Fukuda, 2000). Le lanthanum, un bloqueur de canal à Ca^{2+} de la membrane plasmique, inhibe la mort dans plusieurs cas, mais demeure sans effet sur les mécanismes de défense plus généraux. Par ailleurs, le RE, un réservoir majeur de Ca^{2+} intracellulaire, est aussi important dans le transport des protéines hydrolytiques aux vacuoles et comme source de membranes lipidiques pour la formation de vésicules autophagiques (voir Marty, 1999; Toyooka *et al.*, 2001). Des développements récents dans la régulation de l'apoptose par la modulation des flux de calcium suggèrent un rôle central pour ce messenger et le RE dans l'intégration et la signalisation de plusieurs stimuli (dont le H_2O_2) (voir section 1.2.3.4). Il se pourrait bien que se soit aussi le cas chez les plantes, mais cette hypothèse reste à être explorée dans cette nouvelle perspective. De plus, le RE et le Ca^{2+} semblent aussi liés à la mort de type autophagique (comme par exemple la formation des TE et la mobilisation des réserves de l'aleurone, des cotylédons ou des autres feuilles) renforçant l'idée d'un rôle majeur et conservé du Ca^{2+} dans la régulation et la signalisation de la mort.

1.3.3.2 Régulateurs

Un portrait global des sentiers de signalisation de la PCD chez les végétaux semble donc sur le point d'émerger. Mais les régulateurs impliqués et leur influence sur ces sentiers sont mal connus.

Plusieurs mutants présentant une PCD inappropriée ont été caractérisés, particulièrement dans le cadre de la HR (voir Heath, 2000; Shirasu et Schulze-Lefert, 2000). Certaines modifications dans des gènes *R* peuvent déclencher la HR sans présence de pathogène. Des mutants avec des résistances accrues à des pathogènes démontrent aussi la formation de lésions spontanées dans diverses conditions. Par exemple, chez les mutants *mlo* de l'orge, des lésions discrètes apparaissent sur les feuilles juste avant le début de la sénescence. Mlo est une protéine à sept hélices transmembranaires située dans la membrane plasmique qui confère une résistance au mildiou (*Erysiphe graminis*) qui ne dépend pas de la race du pathogène; par contre, la suppression de la croissance du pathogène arrive avant la mort de cellules de l'hôte, et semble plutôt due au renforcement des parois, lié à la présence de ROS. Fait intéressant, les mutants *mlo* sont plus susceptibles à un autre champignon, *Magnaporthe grisea*, un biotrophe facultatif qui peut sécréter des toxines pour tuer les cellules pénétrées avant de poursuivre la colonisation et qui semble donc ainsi être avantagé par la mort cellulaire plus prompte chez les plantes *mlo*. Les mutants *lsd* d'*Arabidopsis* présentent aussi des lésions spontanées et une résistance accrue. Par exemple, les plantes *lsd1* présentent des lésions grandissantes suite à l'exposition à divers stimuli (comme des jours longs et les ROS) et une résistance accrue à différents pathogènes bactériens et fongiques. Cette résistance, comme chez les *mlo*, intervient avant l'apparition des lésions. Contrairement à certains mutants *lsd* qui requièrent l'action de l'acide salicylique et induisent des mécanismes de défense généraux, d'autres, dont *lsd1*, n'en ont pas besoin. Il a plutôt été suggéré que les plantes *lsd1* sont plus sensibles aux ROS que les plantes sauvages et que leur phénotype dépend de cette sensibilité.

Plusieurs transgènes induisent aussi chez les végétaux le phénotype de la HR. Par exemple, l'expression de gènes d'avirulence ou d'éliciteurs non spécifiques provenant de pathogènes induisent des lésions similaires à la HR, tout comme des antisens (qui inhibent la production) d'enzymes antioxydantes (revu par Mittler et Rizhsky, 2000). Les végétaux

n'ont pas de membres de la famille de Bcl-2, mais plusieurs régulateurs de cette famille ont démontré leur fonctionnalité chez les plantes. Des plantes de tabac exprimant les anti-apoptotiques Bcl-X_L ou CED-9 sont résistantes à la PCD induite par les UV et le paraquat (Mitsuhara *et al.*, 1999) et leur progéniture est aussi plus résistante à des stress causés par le sel, le froid et les blessures, possiblement grâce à une contribution de ces protéines au maintien de l'homéostasie des organelles (Qiao *et al.*, 2002). Une autre équipe a aussi produit des tabacs transgéniques exprimant Bcl-X_L, CED-9 ou l'anti-apoptotique Op-IAP du baculovirus et a démontré leur résistance à différents pathogènes fongiques et viraux (Dickman *et al.*, 2001). Le pro-apoptotique Bax a aussi été exprimé transitoirement à l'aide d'un vecteur viral chez des feuilles de tabac, ce qui a causé l'apparition de lésions similaires à celles qui surviennent lors de la HR (Lacomme et Santa Cruz, 1999). Des plantules d'*Arabidopsis* transformées pour exprimer Bax de manière inductible cessent de croître et dégèrent après induction (Kawai-Yamada *et al.*, 2001). La fonctionnalité de certains membres de la famille de Bcl-2 chez les plantes suggère une action au niveau de sentiers fondamentaux conservés entre les végétaux et les animaux.

Par contre, très peu d'homologues de régulateurs de l'apoptose ont été identifiés chez les végétaux. Par exemple, un homologue végétal de Rac, un des facteurs cytosoliques du complexe NADPH oxydase des animaux, active la production de ROS et la PCD chez le riz (Kawasaki *et al.*, 1999). Un homologue de Rac a aussi été identifié chez l'orge (Hückelhoven *et al.*, 2001). Une autre protéine qui a été impliquée dans la régulation de l'apoptose, DAD1, est aussi bien conservée chez les plantes. DAD1 inhibe la PCD lors du développement de *C. elegans* et l'homologue d'*Arabidopsis* est aussi efficace que la protéine humaine dans la complémentation d'une lignée mutante de cellules de hamster (Gallois *et al.*, 1997). DAD1 fait partie du complexe oligosaccharyl transférase des mammifères, impliqué dans la glycosylation (Kelleher et Gilmore, 1997). Rac et DAD1 sont impliquées dans des sentiers métaboliques importants pour la cellule et leurs rôles ne semblent donc pas exclusifs à la régulation de la PCD.

La protéine BI-1 (*Bax inhibitor-1*) présente un intérêt particulier dans l'étude de la régulation de la PCD végétale et de son évolution. Identifié dans une banque d'ADNc humains grâce à sa capacité à inhiber la mort induite par Bax chez la levure, le BI-1 humain

empêche aussi l'apoptose déclenchée par la surexpression de Bax ou par différents autres stimuli apoptotiques chez les cellules humaines 293 (Xu et Reed, 1998). Le BI-1 humain est retrouvé dans les membranes intracellulaires où il peut s'associer directement avec Bcl-2 et Bcl-X_L, mais pas avec Bax ou Bak (Xu et Reed, 1998). Des homologues végétaux de BI-1 ont par la suite été clonés chez *Arabidopsis* (AtBI-1) et le riz (OsBI-1), et ont démontré pouvoir empêcher la PCD induite par Bax chez la levure (Kawai *et al.*, 1999; Sanchez *et al.*, 2000). Fait intéressant, des plantes blessées mécaniquement ou attaquées par un pathogène (spécifique ou non) présentent une accumulation rapide de l'ARNm codant pour AtBI-1 (Sanchez *et al.*, 2000). Un homologue a aussi été cloné chez l'orge et sa transcription est accrue lors de l'attaque par le mildiou (Hückelhoven *et al.*, 2001). L'homologue du pin est aussi relativement très abondant (environ 600^e sur 15 000) dans une banque d'EST de xylème en formation (John MacKay, communication personnelle), un procédé lors duquel le rôle de la PCD est reconnu (Kozela et Regan, 2003). BI-1 représente donc un des rares régulateurs de la PCD qui semble conservé structurellement et fonctionnellement à travers l'évolution et doit donc agir sur un ou des sentiers conservés entre les règnes animal et végétal. Mais le mode d'action de BI-1 ainsi que les voies de signalisation qu'il influence demeurent inconnues, et leur élucidation pourrait bien ajouter une nouvelle dimension à notre conception de la PCD. C'est ce qui a motivé notre équipe, lancée avec le clonage des homologues de BI-1 chez *N. tabacum* et *Brassica napus* par Nathalie Bolduc, à étudier la fonction de cette protéine dans la régulation de la PCD.

1.4 Hypothèse et buts du projet

La PCD est essentielle et ubiquitaire chez les animaux et les végétaux. Malgré que certains régulateurs et effecteurs majeurs de l'apoptose ne soient pas retrouvés chez les plantes, la similarité de plusieurs caractéristiques morphologiques et biochimiques suggère une origine de la PCD évolutivement très ancienne. On peut alors supposer que certains sentiers régulant la PCD sont fonctionnellement conservés entre les règnes animal et végétal et que, par conséquent, des régulateurs végétaux peuvent avoir les mêmes effets chez les animaux et inversement.

Dans cette perspective, nous avons entrepris, d'une part, de vérifier la capacité d'homologues végétaux de BI-1 d'inhiber la PCD entraînée par la surexpression de Bax chez des cellules humaines. Exactement comme pour la caractérisation du BI-1 humain, des cellules humaines 293 ont été transfectées de façon transitoire et la mort cellulaire a été évaluée à l'aide d'un colorant d'exclusion. Une analyse informatique exhaustive de plusieurs homologues de BI-1 visant la démonstration de la conservation de la structure de cette protéine et l'élaboration d'un modèle structural pouvant déboucher sur un mécanisme d'action putatif a aussi été effectuée.

D'autre part, nous avons entrepris le développement et la caractérisation d'un modèle de mort cellulaire induite par Bax chez les végétaux. Deux approches impliquant la transformation *via Agrobacterium* ont été retenues : l'expression transitoire *in planta* et l'établissement de lignées cellulaires stables, pour lesquelles l'expression du transgène est soit constitutive, soit inductible. La transformation a été vérifiée et le phénotype caractérisé morphologiquement et biochimiquement.

Chapitre 2 Méthodologie

2.1 Analyses informatiques

2.1.1 Séquences

Les séquences protéiques déduites d'homologues de BI-1 utilisées pour l'analyse informatique proviennent de la base de données GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Protein>) et leurs numéros d'accension sont les suivants : *B. napus*, AAK73101; *N. tabacum*, AAK73102; *A. thaliana*, BAA89541; *H. vulgare*, CAC37797; *O. sativa*, BAA89540; humain, P55061; *Rattus norvegicus*, P55062 et *Drosophila melanogaster*, Q9VSH3. La séquence de l'homologue du pin (*Pinus taeda*) origine d'une banque d'EST de xylème (<http://web.ahc.umn.edu/biodata/nsfpine>, contig 7022) du Center for Computational Genomics and Bioinformatics; il est à noter qu'il manque pour cette dernière l'extrémité C-terminale de la protéine déduite (quelques acides aminés).

2.1.2 Alignement de séquences

Les séquences protéiques déduites ont été alignées à l'aide du logiciel ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) (version 1.81; disponible à <ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/>) en utilisant les séries de matrices Gonnet. L'alignement ainsi généré a ensuite été soumis au logiciel Boxshade (version 3.2; <http://iubio.bio.indiana.edu/soft/molbio/align/boxshade/>) pour colorer les résidus selon qu'ils sont identiques ou similaires à une séquence consensus générée par le programme. Cette représentation de l'alignement a subséquemment été retouchée avec CorelDraw 8.

2.1.3 Analyse phylogénétique

Un arbre phylogénétique sans racine a été généré par ClustalX par la méthode de *Neighbour-Joining* à partir de l'alignement des séquences protéiques déduites. L'arbre produit a été validé par une analyse *bootstrap* avec $n = 1000$, aussi effectuée avec ClustalX. L'arbre produit a ensuite été dessiné à l'aide du logiciel TreeView (version 1.6.6; disponible à <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>).

2.1.4 Recherche de signaux de localisation intra-cellulaire

Les séquences protéiques déduites ont été soumises à plusieurs algorithmes, basés sur différentes méthodes, pour prédire la localisation intracellulaire de la protéine. Tous sont accessibles *via* ExPASy (<http://ca.expasy.org/>). Les principaux utilisés sont : PSORT (Nakai et Kanehisa, 1992); ChloroP (Emanuelsson *et al.*, 1999); TargetP (Emanuelsson *et al.*, 2000) et iPSORT (Bannai *et al.*, 2002).

2.1.5 Prédiction des domaines transmembranaires et de leur topologie

Différents programmes ont été utilisés pour détecter la présence de domaines transmembranaires et leur topologie dans les séquences protéiques déduites. Tous sont accessibles *via* ExPASy (<http://ca.expasy.org/>). Quatre programmes utilisant des méthodes différentes ont été retenus : Tmpred; SOSUI (Hirokawa *et al.*, 1998); TMHMM (Krogh *et al.*, 2001) et TopPred (von Heijne, 1992).

Pour concilier en un seul modèle les prédictions différant dans le nombre des domaines transmembranaires et dans leur position, toutes les prédictions (chaque séquence par chaque programme) ont été comparées pour les séquences alignées, en portant une attention particulière aux séquences végétales. Deux niveaux de confiance ont été établis : *i*) pour être comprise dans une région transmembranaire hautement probable (TMhp), une position particulière de l'alignement doit avoir été prédite comme faisant partie d'un domaine transmembranaire (TM) pour au moins trois des cinq séquences végétales (excepté celle de *P. taeda*, inconnue à ce moment) par au moins trois programmes sur quatre; *ii*) pour être comprise dans une région transmembranaire probable (TMp), une position doit être prédite comme faisant partie d'un TM dans au moins 20 % des vingt prédictions impliquant des séquences de plantes.

2.2 Matériel biologique

2.2.1 Cellules humaines

Les cellules humaines embryonnaires de rein 293 nous ont été généreusement données par le Dr André Darveau, Université Laval. Les cellules ont été maintenues dans un incubateur à 37°C, 5 % CO₂, dans du milieu IMDM (*Iscove's modified Dulbecco's medium*; Gibco BRL, cat. #12440-053) contenant 10 % v/v de FBS (HyClone, cat. #SH30071)

décomplémenté dans des flacons de culture de 75 cm² traités pour les cellules adhérentes. Les cultures ont été passées à tous les quatre jours, alors qu'elles atteignaient 70-80 % de confluence, en transférant 1/10 du volume de la culture trypsinisée dans 10 ml de milieu frais.

2.2.2 Plantes

Les plantes de *N. tabacum* cv Xanthi NC ont poussé en terre à partir de graines au Pavillon Marchand (local 0171), sous un éclairage artificiel (tubes fluorescents, 16 heures par jour) supplémenté de lumière naturelle.

2.2.3 Cellules végétales

Les cellules de *N. tabacum* cv Bright Yellow-2 ont été obtenues du Dr Richard N. Trelease, Arizona State University. Les cultures ont été maintenues dans le noir, avec agitation de 100 rpm et ont été repiquées tous les 7 jours en transférant 1,1 ml de culture dans 50 ml de milieu BY-2 [sels MS (Sigma) additionnés de 100 mg/l myo-inositol, 255 mg/l KH₂PO₄, 30 g/l sucrose, 1 µM 2,4-D et 1 mg/l thiamine; pH 5,0] frais dans un erlenmeyer de 250 ml. Les lignées transgéniques ont été maintenues en présence de l'agent sélectif approprié en tout temps et ont aussi été conservées sur milieu gélosé.

2.2.4 Bactéries

Les souches *E. coli* DH5α ou XL-1 Blue ont été utilisées pour les sous-clonages et ont poussé dans du milieu LB (10 g/l NaCl, 10 g/l tryptone, 5 g/l yeast extract), à 37°C, avec agitation de 200-300 rpm, 14 à 18 heures.

La souche *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 a été utilisée pour la transformation de cellules végétales et a poussé dans du milieu YEP (10 g/l bacto peptone, 10 g/l extrait de levure et 5 g/l NaCl) supplémenté de 100 µg/ml streptomycine, à 28 °C, avec agitation de 200-250 rpm, de 24 à 48 heures.

2.3 Plasmides et constructions

2.3.1 Sources du matériel

Le clone d'ADNc de l'isoforme α de *bax* murin a été fourni par le Dr Serge Côté, Héma-Québec. Le vecteur binaire pTA7001 pour l'expression inductible par la dexaméthasone (Aoyama et Chua, 1997; McNellis *et al.*, 1998; Kunkel *et al.*, 1999) a été obtenu du Dr Nam-Hai Chua, Rockefeller University, New York. Le plasmide pCDNA3 pour l'expression dans les cellules animales a été offert par le Dr André Darveau. Le clone de sGFP (une version « synthétisée » sur la base de l'usage des codons optimal pour l'humain, *Arabidopsis* et le maïs; mutant S65T) a été obtenu du Dr Guy Bellemarre.

2.3.2 Méthodes générales

Cette section résume la méthodologie utilisée pour la construction des plasmides. Pour plus de détails sur les méthodes conventionnelles de biologie moléculaire, consulter Sambrook *et al.* (1989). Les constructions principales sont présentées à la section 2.4.3.

2.3.2.1 Préparation d'ADN plasmidique

L'ADN plasmidique destiné au clonage, au séquençage automatique, à la préparation d'une sonde, à la transfection de cellules animales ou à la transformation d'*Agrobacterium* a été préparé à l'aide des trousseaux QIAprep mini, midi ou giga (QIAGEN), selon les recommandations du fabricant. Le dosage a ensuite été effectué au spectrophotomètre (GeneQuant, Pharmacia) et la qualité de la préparation a été évaluée à la fois par le ratio A_{260} / A_{280} et sur gel d'agarose.

2.3.2.2 Amplification PCR

Les inserts destinés au clonage ont souvent été obtenus par réaction de polymérisation en chaîne. Toutes les constructions impliquant un produit PCR ont été vérifiées par séquençage automatique au service du Pavillon Marchand.

Afin de minimiser les risques d'erreur dans l'amplification, 25-50 ng de plasmide ont servi de gabarit pour 25 cycles d'amplification. Les produits PCR ont été analysés et purifiés sur gel d'agarose avant d'être digérés.

2.3.2.3 Digestions

Les plasmides et les inserts destinés au clonage ont été digérés par un excès des enzymes de restriction appropriées, selon les recommandations des fournisseurs (New England BioLabs, Gibco BRL, Amersham Pharmacia Biotech). Les produits de digestion ont été analysés et purifiés, puis dosés sur gel.

2.3.2.4 Purification et dosage sur gel d'agarose

Les fragments ont été purifiés à la suite d'une migration sur gel d'agarose (0,6 – 1,0 %) et les bandes désirées ont été découpées du gel en minimisant l'exposition aux U.V. L'ADN a ensuite été extrait de l'agarose à l'aide de la trousse QIAquick *Gel extraction kit* (QIAGEN), selon les recommandations du fabricant.

La concentration des fragments purifiés destinés à la ligature a été évaluée sur gel par comparaison avec le marqueur *Low DNA mass ladder* (Gibco BRL).

2.3.2.5 Ligature et électroporation

Pour les ligatures, 50-100 ng de vecteur et 3 fois plus de molécules d'insert ont été dilués et chauffés à 50 °C pour cinq minutes. Le mélange a été laissé à la température de la pièce cinq minutes puis le tampon commercial et l'ADN ligase ont été ajoutés pour compléter le volume à 20 µl. Pour une ligature rapide, 400 U de ligase concentrée (New England BioLabs) ont été utilisées et le mélange a été incubé à température pièce 10 minutes (et, dans certains cas, 10 minutes supplémentaires à 16 °C). Alternativement, 40 U de ligase ont été utilisées et l'incubation s'est poursuivie une nuit à 16 °C. Par la suite, 0,5-1 µl du produit a été utilisé pour l'électroporation de 50 µl de cellules *E. coli* électrocompétentes.

2.3.2.6 Sélection d'un clone par analyse de restriction

L'ADN plasmidique d'une dizaine de colonies résistantes aux antibiotiques appropriés a été préparé par une méthode rapide de lyse alcaline décrite par Ziskind et Bernstein (1992). Les préparations (1-5 µl) ont ensuite été digérés avec différentes combinaisons d'enzymes de restriction (2-5 U) et analysés sur gel d'agarose pour choisir un clone et vérifier la construction.

2.3.2.7 Transformation d'*Agrobacterium*

Les souches d'*Agrobacterium* pour la transformation de cellules végétales ont été produites par une méthode standard de gel-dégel. Brièvement, 1 µg de plasmide a été mélangé à 200 µl de cellules compétentes et le tout a été surgelé dans l'azote liquide puis dégelé à 37 °C. Après avoir rajouté 1 ml de milieu YEP et incubé 2-4 heures à 28 °C avec agitation, 50-100 µl ont été étalés sur un pétri de milieu YEP contenant les antibiotiques appropriés. Les transformants sont apparus après 2-3 jours d'incubation à 28 °C.

2.3.3 Constructions

Le tableau 1 résume les constructions utilisées pour les différentes expériences de transformation.

Tableau 1
Constructions utilisées pour la transformation

Utilisation	Vecteur (Promoteur / Sélection)	Protéines produites
Expression transitoire dans les cellules animales	pcDNA3 (CMV, constitutif)	Bax Gus BnBI-1 NtBI-1 Bcl-2
Transformation stable et transitoire de cellules de tabac <i>via Agrobacterium</i>	pBI (CaMV 35S, constitutif / kanamycine)	Bax fusion sGFP/Bax fusion Bax/Gus sGFP Gus
Transformation stable de cellules de tabac <i>via</i> <i>Agrobacterium</i>	pTA7001 (cassette inductible par la dexaméthasone / hygromycine)	Bax fusion Bax/Gus Gus

2.4 Essai fonctionnel chez les cellules animales

La capacité de BnBI-1 et NtBI-1 d'inhiber l'apoptose induite par la surexpression de Bax murin chez des cellules animales a été vérifiée, en collaboration avec Nathalie Bolduc, essentiellement tel que décrit par Xu et Reed (1998) pour le BI-1 humain, avec des modifications mineures. Sommairement, 8×10^5 cellules 293 en phase exponentielle ont étéensemencées dans 4 ml de milieu IMDM contenant 10 % de FBS dans des pétris de 60 mm pour la culture de cellules adhérentes et co-transfectées 24 h plus tard avec un total de

9 µg de plasmide pcDNA3 codant pour Bax, Bcl-2, BnBI-1 ou NtBI-1, ou de vecteur sans insert (comme témoin), par une méthode de précipitation au calcium-phosphate adaptée de Sambrook *et al.* (1989). Brièvement, l'ADN a été dilué dans de l'eau déionisée pour donner un volume de 187,5 µl; 62,5 µl de CaCl₂ 1 M ont été ajoutés à la dilution et immédiatement, 250 µl de HBS 2X ont été déposés goutte à goutte et mélangés en relâchant doucement deux fois un volume d'air au fond du tube. Les tubes ont été incubés 20-30 minutes à température pièce en évitant de les remuer et les précipités ont été déposés dans les pétris. Six à huit heures plus tard, les cellules ont été délicatement lavées 3 fois avec 3 ml de tampon HEPES (10mM avec 140 mM NaCl et 7 mM KCl, pH 7,3) puis 4 ml de milieu frais ont été ajoutés.

Les cellules flottantes et adhérentes (après trypsinisation) ont été récoltées 24 h après la transfection et le pourcentage de cellules mortes a été déterminé à l'aide du colorant d'exclusion bleu de trypan (0,1 %). Au moins trois cent cellules ont été comptées pour chaque essai à l'aveugle et les résultats d'au moins trois expériences indépendantes, chacune faite en triplicata, ont servi aux calculs. La fragmentation nucléaire associée à l'apoptose a été vérifiée par coloration au DAPI, comme décrit par Zha *et al.* (1996a). Un taux de transformation de 65-75 % a été estimé en incluant 1 µg de pcDNA3-Gus aux transfections et en comptant sur un hématocytomètre la proportion de cellules contenant un précipité bleu, après incubation d'une nuit avec le substrat 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-glucuronide (X-Gluc; voir section 2.9).

2.5 Expression transitoire *in planta*

L'infiltration d'*Agrobacterium* dans des feuilles de tabac a été réalisée selon la méthode décrite dans Rubino *et al.* (2001), avec quelques modifications. Brièvement, les souches d'*Agrobacterium* ont poussé jusqu'en fin de phase logarithmique et ont été resuspendues à une D.O.₆₀₀ de 3,0 dans des sels MS additionnés de 10mM MES pH 5,6; 20 g/l sucrose et 200 µM acétosyringone. Cette suspension bactérienne a été forcée à travers les stomates, sur la face inférieure d'une feuille mature (d'une plante au stade 6-8 feuilles matures), à l'aide d'une seringue de 6 c.c. sans aiguille. Pour plus de facilité, les plantes ont été incitées à ouvrir leurs stomates par un arrosage abondant et l'exposition à une lumière intense plusieurs minutes avant l'infiltration. Des zones infiltrées d'environ 3-6 cm² ont

typiquement été obtenues. Les expériences ont été répétées au moins 3 fois (dépendamment de la construction) et pour chaque répétition, au moins 4-6 infiltrations pour chaque construction ont été réparties sur 2-3 plantes.

L'expression des transgènes a été vérifiée 3-6 jours après l'infiltration. Pour détecter l'activité β -glucuronidase, la région infiltrée a été excisée, incubée avec le substrat X-Gluc (voir section 2.9) et ensuite lavée de sa chlorophylle par plusieurs rinçages dans l'éthanol (d'abord 70%, ensuite 95 %). Pour vérifier l'expression de la GFP, de fines coupes transversales des zones infiltrées ont été faites à la main, placées entre lame et lamelle et observées immédiatement en microscopie confocale. L'estimation de la proportion de cellules transformées, très variable d'une zone d'infiltration à l'autre et selon l'endroit observé dans une même zone, variait de 10 à 90 %.

2.6 Transformation stable de cellules BY-2

Les cellules BY-2 ont été transformées *via Agrobacterium*. Brièvement, 100-120 μ l d'une culture d'*Agrobacterium* de 16-24 heures et 2 μ M acétosyringone ont été ajoutés à 4 ml d'une culture de cellules BY-2 de 3-4 jours. Le tout a été incubé 3 jours à température pièce, dans le noir, avec agitation légère. Les cellules ont par la suite été lavées avec du milieu BY-2 additionné de 300 μ g/ml céfotaxime (pour éliminer *Agrobacterium*), resuspendues dans 5 ml et étalés sur des boîtes de Pétri contenant du milieu BY-2, de la céfotaxime et les antibiotiques pour la sélection des transformants (100 μ g/ml kanamycine pour le vecteur pBI ou 50 μ g/ml hygromycine pour le vecteur pTA7001). Les transformants qui se sont démarqués 3-4 semaines plus tard, ont été isolés pour leur permettre de prendre de l'expansion et plusieurs ont été mis en culture liquide, toujours en présence de l'agent sélectif. Généralement, les cultures liquides se sont uniformisées en quelques repiquages, à se fier aux essais d'activité β -glucuronidase (lorsque possible) avec le substrat X-Gluc (voir section 2.9).

2.7 Analyses de type Northern et Southern

L'ARN total a été extrait de cellules repiquées 3 jours plus tôt par une méthode standard au guanidium thiocyanate et phénol-chloroforme, puis dosé au spectrophotomètre (GeneQuant, Pharmacia). Le dosage et l'intégrité de l'ARN ont été vérifiés sur gel

d'agarose et 10 µg ont été fractionnés sur un gel dénaturant (1% agarose) puis transférés sur des membranes de nylon (Hybond-XL, Amersham Pharmacia Biotech) par capillarité. Une coloration au bleu de méthylène (0,04 % dans 0,3 M acétate de sodium pH 5,2 ; puis décoloration avec de l'eau traitée au DEPC) a permis de vérifier rapidement que des quantités approximativement égales d'ARN étaient présentes sur les membranes. Celles-ci ont été pré-hybridées dans le tampon Church (1 % BSA; 1mM EDTA; 0,5 M NaHPO₄ pH 7,2 et 7 % SDS) à 65 °C, puis hybridées une nuit à 65 °C à une sonde codant pour l'ADNc de *bax* murin pleine longueur, marquée aléatoirement au [α -³²P] dCTP et purifiée sur une colonne de Sephadex G-50 Nick (Amersham Pharmacia Biotech) selon les recommandations du fabricant. Les membranes ont été lavées à stringence élevée (0,2X SSC et 0,1 % SDS à 65 °C) et les signaux ont été détectés par une exposition d'environ 16 heures à des films radiographiques (BioMax MR, Kodak) à -80°C, entre deux écrans intensifiants.

L'ADN de cellules de 5 jours a été extrait par une méthode au CTAB (Doyle et Doyle, 1990) et dosé au spectrophotomètre. Le dosage et l'intégrité de l'ADNg ont été vérifiés sur gel, puis 30 µg ont été digérés par *Eco*RI et *Bam*HI (qui reconnaît un site dans la séquence de *bax*) une nuit. L'efficacité de la digestion a été vérifiée sur gel et 25 µg ont été fractionnés sur gel d'agarose 0,8 % à bas voltage pendant une nuit. L'ADN a été dénaturé, transféré sur une membrane de nylon (Hybond-XL, Amersham Pharmacia Biotech) et hybridé dans le tampon Church à 65°C à une sonde marquée au ³²P codant pour l'ADNc de *bax* murin pleine longueur. Les membranes ont été lavées à stringence élevée (comme ci-dessus) et les signaux ont été détectés par l'exposition de films radiographiques entre deux écrans intensifiants pour deux semaines à -80°C.

2.8 Analyse de type Western

2.8.1 Extraction des protéines et dosage

Les cellules animales ont été récoltées par centrifugation à 300 x g et bouillies 5 minutes dans du tampon de lyse (0,1 M Tris.HCl pH 7,0 ; 5 % SDS ; 20 % glycérol ; 0,1 M DTT) contenant des inhibiteurs de protéases (2 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml pepstatin A, 5 µg/ml aprotinin et 100 µg/ml PMSF). Les cellules végétales ont été broyées dans l'azote liquide et

les protéines ont été solubilisées dans du tampon PTE (1X PBS, 1 % Triton X-100, 5 mM EDTA, 2 mM DTT) additionné des inhibiteurs de protéases.

Les lysats cellulaires ont ensuite été clarifiés par centrifugation (13 000 x g, 15 min à 4°C) et les protéines totales des surnageants ont été dosées par une adaptation de la méthode de Bradford (1976). Brièvement, 0,5-2 µl des extraits ont été ajoutés à 200 µl de réactif de Bradford dans une plaque multi-puits, avec en parallèle 0-3 µg d'un standard BSA (Sigma), et les D.O.₆₅₀ ont été enregistrées par un lecteur de plaque *Vmax kinetic microplate reader* (Molecular Devices).

2.8.2 Électrophorèse et immunodétection

Les protéines (50 µg pour les extraits de cellules animales et 100 µg pour les extraits végétaux) ont été séparées sur un gel SDS-polyacrylamide 12 %, transférées sur une membrane de PVDF (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech) et bloquées avec du lait écrémé (5 % dans TBS).

La détection des antigènes a été effectuée à l'aide des anticorps suivants, dilués dans du tampon de blocage (Roche Molecular Biochemicals) : sérum de lapin anti-BI-1 (dirigé contre un peptide synthétique correspondant aux a.a. 233-247 de AtBI-1) 1:400 ; anti-Bax de souris (spécifique aux acides aminés 8-16 de Bax murin, Calbiochem) 1 µg/ml ; anti-Bcl-2 de chèvre (R&D Systems) 1 µg/ml ; anti-GFP de lapin (Molecular Probes) 2 µg/ml ; anti-souris de chèvre, anti-lapin de chèvre et anti-chèvre d'âne conjugués à la peroxydase (Jackson ImmunoResearch Laboratories) 0,5 µg/ml. Un substrat chemiluminescent (Lumi-Light ou BM Chemiluminescence Blotting Substrate, Roche Molecular Biochemicals) a révélé la présence des anticorps liés par exposition à un film photographique.

2.9 Détection et quantification de l'activité β -glucuronidase

L'activité Gus a été détectée par incubation des tissus une nuit à 37°C dans une solution contenant le substrat X-Gluc (1 mM; 0,5 mM ferrocyanide de potassium; 0,5 mM ferricyanide de potassium et 10 mM EDTA pH 7,0 dans du PBS 1X). Le produit de la réaction enzymatique donne un précipité bleu.

La quantification de l'activité β -glucuronidase a été réalisée essentiellement comme décrit par Jefferson (1987). Brièvement, les protéines totales ont été extraites et dosées par la méthode de Bradford. L'activité des extraits a été déterminée par une cinétique suivie pendant 2 heures en présence du substrat 4-methylumbelliferyl β -D-glucuronide (MUG ; Sigma) qui est clivé en un produit fluorescent, le 4-methylumbellifère (MU). La prise de données a été faite avec des cuvettes de quartz dans un spectrofluorimètre modèle TKO 100 (Hofer Scientific Instruments) muni d'un filtre d'excitation à 365 nm et d'un filtre d'émission à 455 nm et calibré à l'aide d'un standard MU (Sigma). L'activité des extraits a ensuite été normalisée en $(\text{nM MU})(\text{min})^{-1} (\text{mg de protéines totales})^{-1}$. Les expériences ont été répétées trois fois.

2.10 Évaluation de la croissance des cultures cellulaires

La cinétique de croissance des cultures de cellules BY-2 a été évaluée par la mesure du PCV (*packed cell volume*) obtenu en centrifugeant 15 ml de culture à 100 x g à température pièce pendant 5 minutes. Les résultats ont été normalisés en ml de cellules par ml de culture et au moins deux expériences indépendantes ont servi aux calculs.

2.11 Quantification de la mort cellulaire

2.11.1 Méthode microscopique

Les parois cellulaires ont été partiellement digérées (1 h 30, à température pièce) avec 0,25 % macerozyme R-10 (Yakult Pharmaceutical) et 0,1 % pectolyase Y-23 (Kikkoman Co.) dans une solution de maintien (0,4 M mannitol, 8 mM CaCl_2) pour dissocier les cellules et faciliter le comptage. Après avoir été lavées et resuspendues dans la solution de maintien, le pourcentage de cellules ne pouvant exclure le bleu d'Evan (0,2 %) a été déterminé par comptage sur un hématocytomètre. Au moins 500 cellules ont été comptées pour chaque essai.

2.11.2 Méthode spectrophotométrique

La proportion de cellules ne pouvant exclure le bleu d'Evan a aussi été déterminée par une méthode spectrophotométrique inspirée de Delledonne *et al.* (2001). Brièvement, deux fois 250-500 μl de chaque culture ont été prélevés à l'aide d'une micropipette munie d'un embout coupé et une des aliquotes a été mis en présence d'éthanol 70 % quelques minutes

pour constituer une référence équivalant à 100 % des cellules mortes pour cette culture. Par la suite, les cellules ont été récoltées (1000 x g, 5 minutes) et resuspendues dans 0,05 % bleu de Evan dans du PBS. Le colorant excédentaire a été éliminé par plusieurs lavages dans du PBS et le colorant lié a été solubilisé dans 50 % méthanol, 1 % SDS à 50°C pour 30 minutes. Les débris cellulaires ont été éliminés par centrifugation et la D.O.₆₅₀ des surnageants a été lue dans une plaque multi-puits à l'aide d'un lecteur *Vmax kinetic microplate reader* (Molecular Devices).

2.12 Test TUNEL sur des cellules végétales en culture

La fragmentation de l'ADN nucléaire a été détectée en microscopie à l'aide de la trousse *ApoAlert[®] DNA Fragmentation Assay kit* (Clontech, cat. # K2024), basée sur l'ajout de nucléotides marqués à la fluorescéine par la terminale transférase aux extrémités 3'-OH libres de l'ADN fragmenté.

Brièvement, les cellules provenant de 300-500 µl d'une culture ont été fixées 30 minutes dans du paraformaldéhyde 4 % frais et lavées avec du PBS. Les parois ont été partiellement digérées par une incubation de 2 heures à 30 °C, avec agitation délicate, dans 0,1 % pectolyase Y-23 et 8 mM MgSO₄ dans du PBS. Les cellules ont alors été déposées sur des lames traitées à la poly-L-lysine et séchées une nuit. La perméabilisation a été faite 30 minutes à température pièce avec 0,5 % Triton X-100, 15 mM glycine dans du PBS et le marquage par la terminale transférase a été effectué selon les recommandations du manufacturier. Dans certains cas, tous les noyaux ont aussi été marqués à l'iodure de propidium (PI) 1 µg/ml, en présence de 0,25 mg/ml RNase (pour éviter le marquage de l'ARN dans le cytoplasme), pendant 5-10 minutes. Les lames ont ensuite été lavées à l'eau, montées dans l'*anti-fade* DABCO (Sigma; 2,5 % dans 90 % glycérol, 10 % PBS 1X) et observées immédiatement.

2.13 Microscopie

Les observations microscopiques ont été réalisées avec un microscope Zeiss Axioplan équipé pour l'épifluorescence et le Nomarski. La microscopie confocale a été effectuée à l'aide d'un instrument Zeiss LSM310. Les images de morphologie cellulaire ont été acquises en utilisant le Nomarski et en scannant en confocal. La GFP et la fluorescéine ont

été visualisées en excitant à 488 nm avec un laser à l'argon et en utilisant un filtre *515/565 bypass*. La fluorescence de la chlorophylle et du PI a été observée en excitant à 543 nm avec un laser hélium/néon et en utilisant un filtre *543 longpass*. Les images obtenues ont été manipulées avec Corel Photo-Paint 8.

Chapitre 3 Résultats

3.1 Analyse structurale et fonctionnelle d'homologues végétaux de BI-1

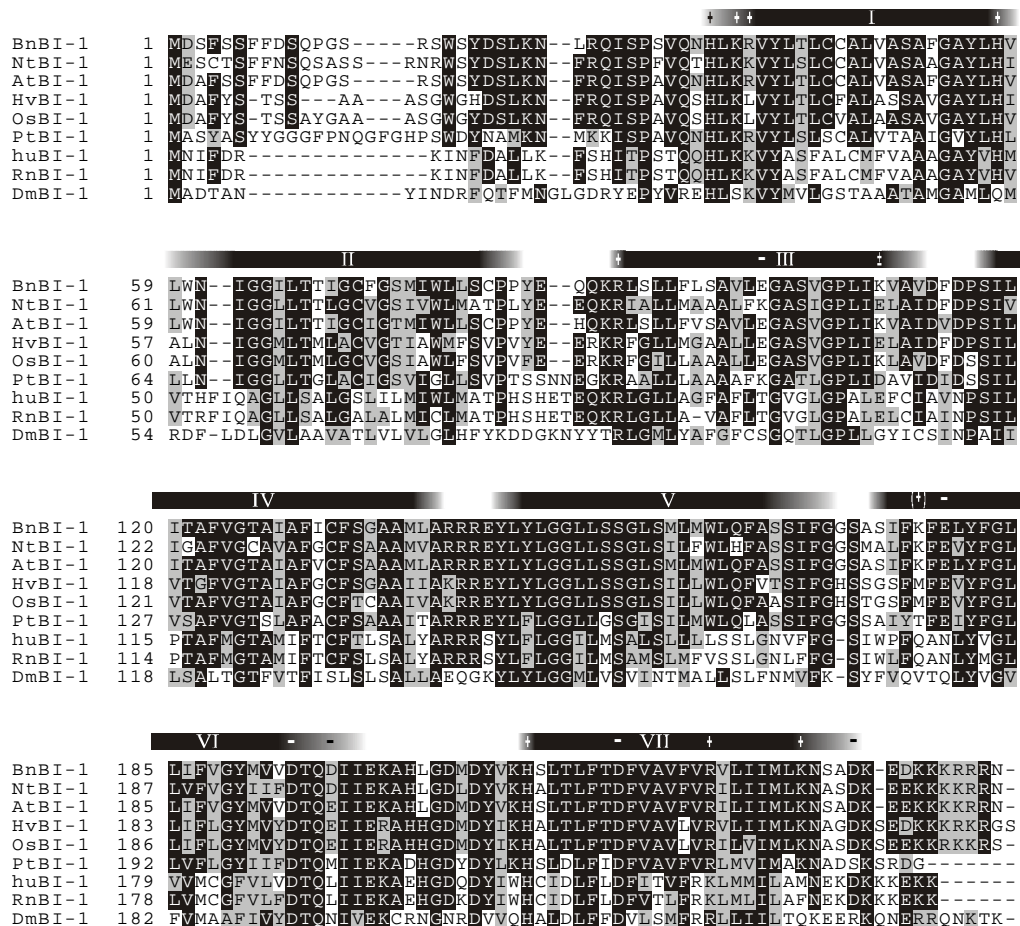
3.1.1 Analyse informatique

3.1.1.1 Comparaison de séquences

L'alignement des séquences protéiques déduites des homologues végétaux connus de BI-1 et de quelques BI-1 animaux a révélé que BnBI-1 et NtBI-1 sont très similaires aux autres BI-1 végétaux et animaux (figure 12A). Par exemple, BnBI-1 et NtBI-1 sont respectivement 93 % et 75 % identiques à AtBI-1, alors qu'ils sont 66-68 % identiques aux homologues du riz et de l'orge. Tous les BI-1 végétaux analysés sont identiques à 38-42 % aux BI-1 de l'humain et du rat, alors que l'identité chute à 26-28 % lorsque la comparaison est faite avec la protéine de la drosophile. La similarité est retrouvée sur toute la longueur de la séquence, sauf pour l'extrémité N-terminale qui est moins bien conservée (notamment, les protéines animales sont plus courtes de plusieurs acides aminés). Cette portion de la protéine pourrait donc être peu ou pas importante pour la fonctionnalité de la protéine.

La divergence des séquences est illustrée par un arbre sans racine calculé à partir de l'alignement (figure 12B). Les séquences animales ont été opposées aux séquences végétales parmi lesquelles l'homologue du pin (un gymnosperme) a été séparé des autres angiospermes. Les angiospermes ont aussi été divisés en monocotylédones (riz et orge) et dicotylédones, desquels la famille des Solanaceae (tabac) a été distinguée des Brassicaceae (*Arabidopsis* et *Brassica*). La répartition des séquences végétales suggère qu'il s'agit d'orthologues véritables, avec une origine évolutive commune. Les valeurs obtenues pour l'analyse *bootstrap* confirment la validité statistique de l'arbre.

A



B

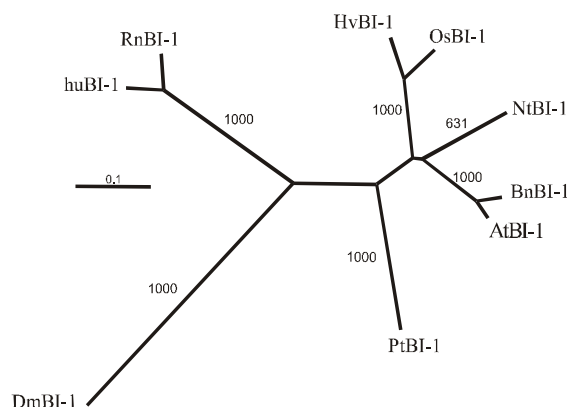


Figure 12 Comparaison des séquences protéiques déduites d'homologues végétaux et animaux de BI-1. (A) Alignement dans lequel les acides aminés identiques et similaires à une séquence consensus sont respectivement sur fond noir et gris. Les bandes numérotées avec des chiffres romains montrent les TMhp (en noir) et leurs extrémités variables (TMp, en dégradé) pour les plantes, dans lesquels les résidus chargés sont indiqués. **(B)** Arbre phylogénétique représentant la divergence des séquences. Les chiffres indiquent le nombre de fois que cet arbre a été produit sur 1000 essais *bootstrap* et la longueur des branches indique la distance évolutive. Bn, *Brassica napus*; Nt, *Nicotiana tabacum*; At, *Arabidopsis thaliana*; Hv, *Hordeum vulgare*; Os, *Oryza sativa*; hu, humain; Rn, *Rattus norvegicus*; Dm, *Drosophila melanogaster*.

3.1.1.2 Prédiction de la localisation intracellulaire

Plusieurs programmes ont été utilisés pour tenter de prédire la localisation intracellulaire de BnBI-1 et NtBI-1 à partir de leurs séquences protéiques déduites. Selon les prédictions de PSORT et TargetP, ces protéines pourraient être localisées au niveau des membranes chloroplastiques. ChloroP et iPSORT ont aussi détecté la présence d'un peptide transit pour le chloroplaste dans la région N-terminale de BnBI-1 et NtBI-1. Un motif de résidus basiques en C-terminal partageant des caractéristiques de certains signaux de localisation nucléaire a été détecté par PSORT. Cette suite de résidus basiques à l'extrémité C-terminale ressemble aussi à un signal de rétention au réticulum endoplasmique. L'analyse de l'hydropathie de BnBI-1 et NtBI-1 (non montrée) démontre la présence de plusieurs régions très hydrophobes dans ces protéines. Ces résultats suggèrent donc fortement une association de ces protéines aux membranes des organelles.

3.1.1.3 Détection des domaines transmembranaires et prédiction de la topologie

Les séquences protéiques déduites des homologues de BI-1 ont été soumises à quatre programmes recherchant les régions transmembranaires. De cinq à sept hélices transmembranaires ont été repérées, selon la séquence et le programme. La position des domaines transmembranaires (TM) dans les homologues végétaux de BI-1 a été déterminée en compilant les prédictions de quatre programmes pour chaque séquence et en établissant deux niveaux de confiance : les domaines transmembranaires hautement probables (TMhp) et les domaines transmembranaires probables (TMp) (voir section 2.1.5).

De cette manière, sept TMhp ont été prédits pour les BI-1 végétaux (figure 12A), chacun avec des extrémités TMp, reflétant la plus grande variabilité des prédictions pour ces régions. La position de ces TM est généralement similaire pour les BI-1 animaux analysés, sauf pour le TM VII qui n'a pas été détecté dans la plupart des cas malgré la grande similarité des séquences. La longueur des TM obtenus est aussi dans l'ordre de grandeur attendu pour une hélice α qui traverse une bicouche lipidique (20-25 a.a.).

La topologie prédite par ces programmes (généralement sur la base de la règle du *positive inside* ; von Heijne, 1992) pour tous les BI-1 a toujours l'extrémité C-terminale, très chargée positivement, du côté cytosolique de la membrane. Ainsi, si les BI-1 animaux ont six TM, leur extrémité N-terminale se retrouverait aussi dans le cytosol, alors que les BI-1

végétaux, avec leurs sept TM, auraient leur N-terminus de l'autre côté de la membrane (ou dans la lumière d'une organelle) (figure 13).

La présence de plusieurs résidus chargés dans les TM est aussi observée (figure 12A), ce qui est très défavorable dans l'environnement hydrophobe de la membrane. Ces résidus chargés à l'intérieur de domaines transmembranaires pourraient alors être stabilisés par des interactions intra et/ou inter protéiques. On remarque plus particulièrement le TM VII, dans lequel quatre résidus chargés sont séparés chacun de sept acides aminés exactement, ce qui les alignerait sur le même côté d'une hélice α (un tour d'hélice comprend en moyenne 3,6 a.a.), dans l'axe de celle-ci.

Étant donné le très faible nombre de protéines membranaires dont la structure a été élucidée, celles-ci sont sous-représentées dans les bases de données de structures protéiques. Ainsi, une structure tertiaire pour NtBI-1 et BnBI-1 n'a pu être prédite par comparaison de leur séquence déduite avec celles de protéines de structure connue.

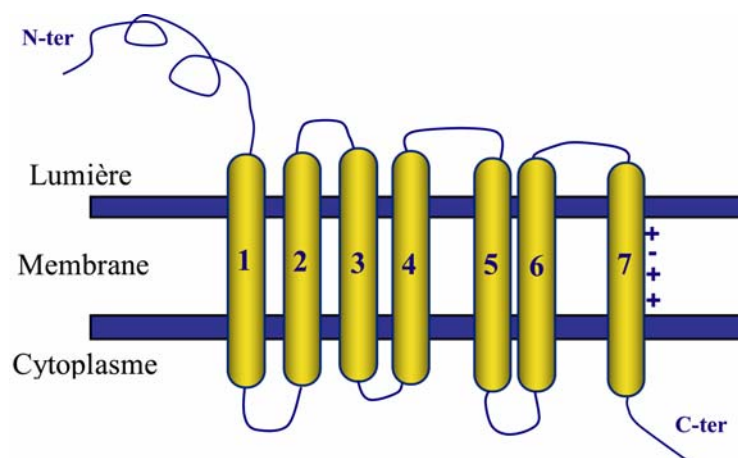


Figure 13 Schéma récapitulatif de certaines caractéristiques structurales déduites des homologues végétaux de BI-1 au sein des membranes des organelles. Voir les explications dans le texte.

3.1.2 Essai fonctionnel de BnBI-1 et NtBI-1 dans le système animal

La capacité de BnBI-1 et NtBI-1 à inhiber l'apoptose induite par la surexpression de Bax chez les cellules animales a été vérifiée à l'aide de l'essai développé par Xu et Reed (1998) pour le BI-1 humain. Des cellules humaines 293 ont été transfectées (à un taux d'efficacité estimé à 65-75 %) avec 9 µg de vecteur parental ou co-transfectées avec un plasmide d'expression codant pour Bax (3 µg) en combinaison avec 6 µg de vecteur parental (comme contrôle négatif) ou de plasmide codant pour BnBI-1, NtBI-1 ou Bcl-2 (contrôle positif). Dans ce système, alors que moins de 5 % des cellules transfectées avec uniquement le vecteur parental sont mortes (selon le test d'exclusion du trypan bleu) 24 h après la transfection, l'expression de Bax a causé la mort de près de 35 % des cellules (figure 14A). Par contre, pour les cellules exprimant Bax en combinaison avec BnBI-1, NtBI-1 ou Bcl-2, le pourcentage de cellules mortes était plus faible (9-13 %). La production de Bax et Bcl-2 par les cellules transfectées a été vérifiée par analyse Western (figure 14A) et seulement les essais où la production de Bax a été détectée en bonne quantité ont été considérés pour les calculs. Les cellules exprimant Bax présentaient aussi la condensation et la fragmentation nucléaire caractéristiques des cellules apoptotiques, mais pas celles exprimant à la fois Bax et NtBI-1 (non montré; voir Bolduc *et al.*, 2003).

Pour vérifier l'influence de la quantité de NtBI-1 sur l'inhibition de la mort cellulaire induite par Bax, 3 µg de plasmide codant pour Bax ont été co-transfectés avec 0,1-6 µg de plasmide codant pour NtBI-1 ou Bcl-2 (comme contrôle) (figure 14B). Dans les deux cas, le pourcentage de cellules mortes suivant la surexpression de Bax n'a pas été diminué par la co-transfection avec 0,1 µg ou 1 µg de plasmide codant pour les suppresseurs de mort, comparativement aux essais sans suppresseur (pour lesquels la mortalité a été évaluée à $25,3 \pm 1,3$ % pour ces expériences). Par contre, une diminution de la proportion de cellules mortes a été observée à partir de 3 µg de plasmide codant pour NtBI-1 ou Bcl-2, avec un effet encore plus important à 6 µg. À 3 µg, Bcl-2 semble cependant plus efficace que NtBI-1 mais la différence entre ces deux points ne semble pas significative. À 6 µg, les deux suppresseurs ont pratiquement la même efficacité, diminuant la proportion de cellules mortes à environ 10 %. La transfection avec uniquement 0,1-6 µg de plasmide codant pour NtBI-1 n'a pas entraîné de phénotype de mort dans ce système.

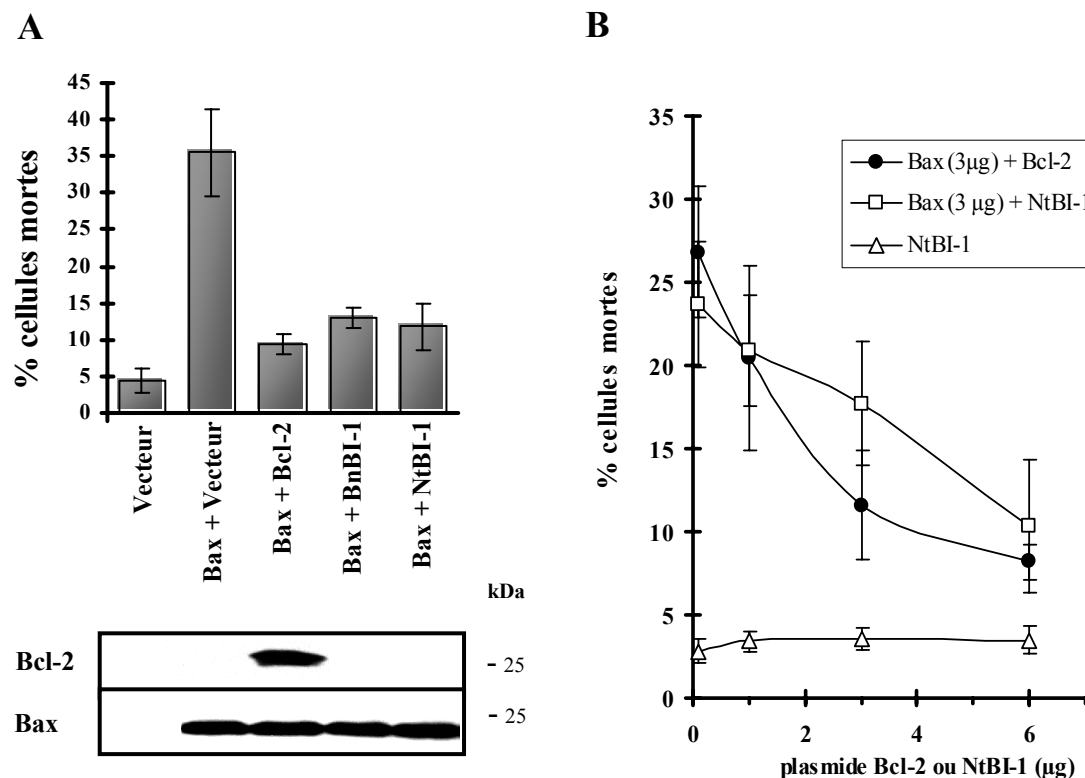


Figure 14 Inhibition de l'apoptose induite par Bax chez les cellules humaines 293 par BnBI-1 et NtBI-1. Le pourcentage de cellules mortes a été déterminé avec l'essai d'exclusion du trypan bleu. (A) Les cellules ont été transfectées avec du vecteur parental (9 μ g) ou avec une combinaison de vecteurs exprimant Bax murin (3 μ g) et soit Bcl-2, BnBI-1 ou NtBI-1 (6 μ g) (panneau du haut). Des extraits protéiques provenant d'une fraction des cellules transfectées ont été soumis à des analyses Western utilisant des anticorps spécifiques à Bax murin ou Bcl-2 (panneau du bas). (B) Les cellules ont été transfectées avec différentes quantités de vecteur codant pour NtBI-1 ou avec une combinaison de vecteurs exprimant Bax (3 μ g) et différentes quantités de vecteur codant soit pour Bcl-2 ou NtBI-1. Les quantités de plasmide ont été ajustées à un total de 9 μ g avec du vecteur parental. Au moins trois cent cellules ont été comptées pour chaque essai à l'aveugle et les résultats d'au moins trois expériences indépendantes, chacune faite en triplicata, ont servi aux calculs; l'incertitude correspond à \pm écart-type.

3.2 Caractérisation de la PCD déclenchée par Bax chez les végétaux

3.2.1 Expression transitoire de Bax *in planta*

La première approche utilisée afin d'étudier la réponse des cellules végétales à l'expression de Bax a été l'expression transitoire dans des feuilles de plantes entières. Des cultures d'*Agrobacterium* portant des vecteurs d'expression pour Bax, les fusions Bax/Gus et

sGFP/Bax ou le rapporteur Gus (comme témoin) ont été infiltrées dans des feuilles de tabac en croissance active. L'expression des transgènes dans ce système a été vérifiée 3-6 jours plus tard par la détection de l'activité β -glucuronidase dans les régions infiltrées pour les essais impliquant Gus (figure 15B) ou la fusion Bax/Gus ou encore par l'observation en microscopie confocale de la fluorescence émise par la GFP en microscopie confocale dans les cas où la fusion sGFP/Bax a été utilisée.

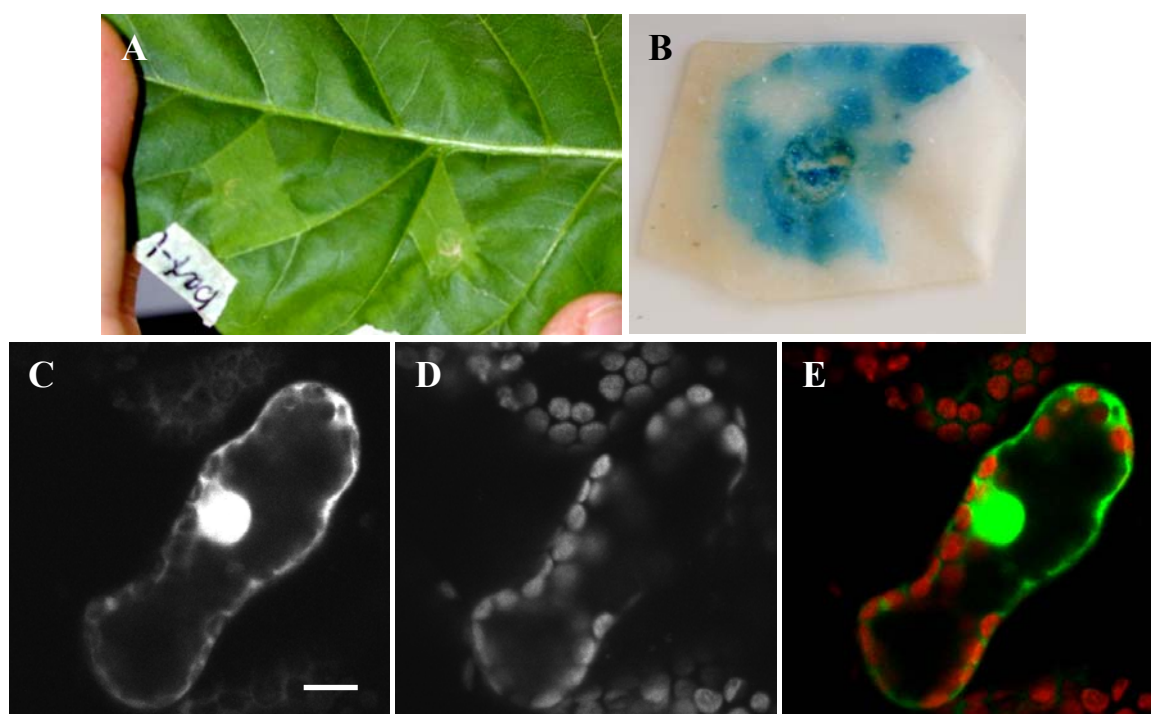


Figure 15 Expression transitoire de Bax dans des feuilles de tabac *via* infiltration d'*Agrobacterium*. (A) Exemple du phénotype observé 5 jours suivant l'infiltration avec une souche permettant l'expression de Bax (à gauche) ou du témoin Gus (à droite). (B) Exemple d'activité β -glucuronidase détectée à l'aide du substrat X-Gluc 5 jours suivant une infiltration pour l'expression de Gus. La réaction enzymatique donne un précipité bleu. (C-E) Localisation de la fusion sGFP/Bax dans une cellule palissadique du mésophylle foliaire. De fines coupes transversales des zones infiltrées ont été faites à la main et observées immédiatement en microscopie confocale en excitant à 488 nm pour visualiser la fusion sGFP/Bax (C) ou à 543 nm pour la chlorophylle dans les chloroplastes (D). Dans la superposition des deux images (E), la fusion sGFP/Bax est colorée en vert et la chlorophylle en rouge. Barre : 20 μ m.

Dans ce système, l'expression de Bax, seul ou en fusion, n'a pas conduit à l'observation d'un phénotype local de mort semblable à la réponse hypersensible (figure 15A), même 10 jours après infiltration (non montré). Toutes les zones infiltrées, les témoins y compris, ont subi une légère décoloration et une marque nécrotique est souvent apparue à l'endroit où l'embout de la seringue a été appuyé lors de l'infiltration. Toutes les zones infiltrées se sont détériorées progressivement pour éventuellement se dessécher complètement 12-15 jours suivant l'infiltration.

La protéine de fusion sGFP/Bax a aussi permis de déterminer la localisation de Bax dans les cellules de la feuille. Dans les cellules palissadiques du mésophyle, un patron de fluorescence caractéristique d'une protéine cytoplasmique a été observé (figure 15C-E). Dans les cellules végétales, la GFP seule est cytoplasmique et diffuse librement dans le noyau (Köhler *et al.*, 1997); la fusion sGFP/Bax correspond à une protéine de ~48 kDa qui devrait aussi pouvoir diffuser à travers les pores nucléaires, dont la limite d'exclusion se situe autour de 40-60 kDa (Lodish *et al.*, 1997). Par la même occasion, la fluorescence de la chlorophylle a été exploitée pour visualiser les chloroplastes, ce qui supporte la localisation cytoplasmique et démontre que Bax ne co-localise pas avec cette organelle dans ces conditions. Une distribution similaire de la protéine de fusion a aussi été observée dans les cellules épidermiques de feuille (non montré).

3.2.2 Lignées cellulaires exprimant Bax

La deuxième approche utilisée pour étudier la réponse des cellules végétales à l'expression de Bax a été l'établissement de lignées cellulaires stables pour lesquelles l'expression du transgène est soit constitutive, soit inductible par la dexaméthasone. Ces dernières sont traitées à la section 3.2.2.8, alors que le reste de la section 3.2.2 est consacré à la caractérisation des lignées dont l'expression est constitutive.

Des cellules BY-2 en culture liquide ont été transformées *via Agrobacterium*, les transformants ont été sélectionnés sur milieu solide à l'aide d'antibiotiques et adaptés à la culture en milieu liquide, toujours en présence de l'agent sélectif, tel que décrit à la section 2.6.

3.2.2.1 Vérification de la transformation

Afin de vérifier et caractériser l'intégration des transgènes à leur génome, les lignées exprimant constitutivement Bax (nommées B) et Bax/Gus (nommées BG) ont été soumises à une analyse de type Southern, en utilisant l'ADNc de *bax* pleine longueur comme sonde. L'ADNg des lignées a été digéré avec *EcoRI* et *BamHI* (qui reconnaît un site de restriction à l'intérieur de *bax*) de sorte que deux bandes sont attendus si une seule copie du transgène est intégrée. De l'ADNg de cellules BY-2 non-transformées a servi de contrôle négatif. Comme le montre la figure 16, la plupart des lignées testées ont intégré plusieurs copies du transgène, dont le nombre varie d'une lignée à l'autre. Certaines lignées semblent n'avoir intégré que quelques copies (comme B3, BG4 et BG9) alors que d'autres présentent plus d'une dizaine de bandes (par exemple B4, B5 et BG5). La méthode utilisée ne permet cependant pas un dénombrement plus précis du nombre de copies. Par contre, la lignée BG8 ne présente aucun signal détectable, tout comme les cellules non-transformées. Il est aussi intéressant de noter que, malgré l'intégration aléatoire, certains sites semblent privilégiés (une caractéristique de la transformation *via Agrobacterium*), comme en témoigne la présence de bandes récurrentes d'une lignée transformée à l'autre. Des conclusions similaires ont été obtenues lorsque l'expérience a été répétée.

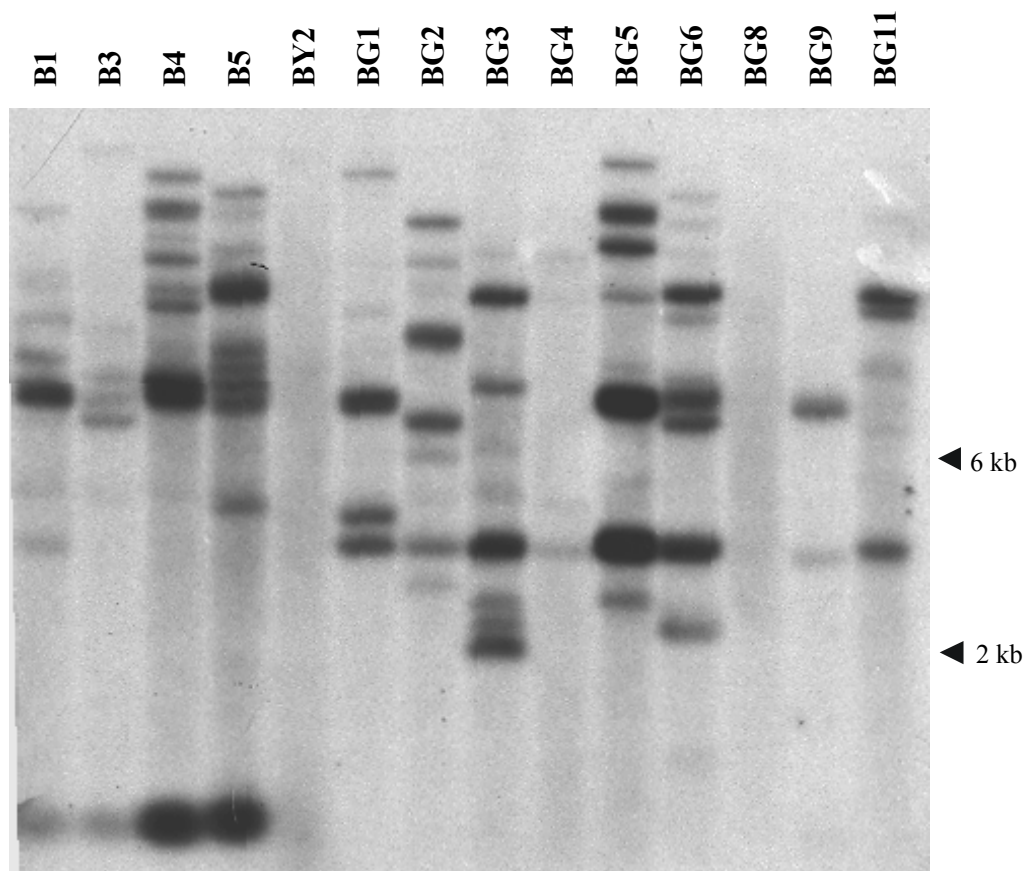


Figure 16 Analyse Southern des lignées transformées avec **Bax** ou **Bax/Gus**. La portion codante de *bax* murin a été utilisée pour la fabrication de la sonde (voir section 2.7).

3.2.2.2 Vérification de l'expression

Plusieurs méthodes ont été utilisées afin de vérifier l'expression des transgènes dans les lignées transformées. Dans un premier temps, l'activité β -glucuronidase des lignées exprimant la fusion Bax/Gus a pu être quantifiée en fluorimétrie par une cinétique en présence du substrat MUG. L'activité de plusieurs lignées a ainsi été déterminée 3, 8, 10 et 13 jours suivant l'ensemencement des cultures (figure 17A). L'activité Gus a été détectée dans toutes les lignées transformées, sauf BG6 et BG8, qui donnaient des activités comparables à l'activité endogène (la lignée BY-2 non-transformée). L'activité maximale a été enregistrée 8 jours après le repiquage et diminuait par la suite, et ce pour la plupart des

lignées. La lignée BG4 avait une activité nettement plus élevée que les autres, et ce à 3, 8 et 10 jours suivant le repiquage.

Pour leur part, les lignées transformées avec Bax ont d'abord été soumises à une analyse de type Northern pour déterminer la présence d'ARNm codant pour Bax. Toutes les lignées transformées exprimaient le transgène à différents niveaux. Les lignées B1 et B2 étaient celles accumulant le plus d'ARNm, alors que la lignée B4 présentait une quantité à peine détectable (figure 17B). Une coloration de la membrane au bleu de méthylène avant l'hybridation a permis de vérifier que des quantités approximativement égales d'ARN étaient présentes sur la membrane (non montré).

Un anticorps anti-Bax a aussi été utilisé pour vérifier par analyse de type Western la présence de la protéine dans les cultures transformées. Les protéines ont été extraites de cultures de 7 jours prélevées en février 2002 de même qu'à l'été 2001 dans le cas de B1 et B3, soit à peu près au moment où les analyses Southern et Northern ont été effectuées. La protéine Bax était détectable, à l'été 2001, dans les deux lignées testées, alors qu'au printemps suivant, Bax n'a été détecté que dans les lignées B1 et B2 (figure 17C). La lignée B3 semble donc avoir cessé d'exprimer le transgène, ce qui suggère que c'est peut-être aussi le cas pour d'autres lignées. Des extraits ont été préparés à plusieurs reprises au printemps 2002, à partir de cultures de 3-9 jours, avec des résultats similaires. Par contre, le même anticorps n'a pu démontrer la présence des fusions Bax/Gus ou sGFP/Bax dans aucun cas, à cause de la forte reconnaissance de plusieurs protéines endogènes de même poids moléculaire (non montré). Malgré cela, la présence de la fusion sGFP/Bax a pu être détectée avec un anticorps dirigé contre la GFP chez 3 des 6 lignées testées, soit SB6, SB11 et SBf (figure 17D). Des résultats similaires ont été obtenus lorsque l'expérience a été répétée.

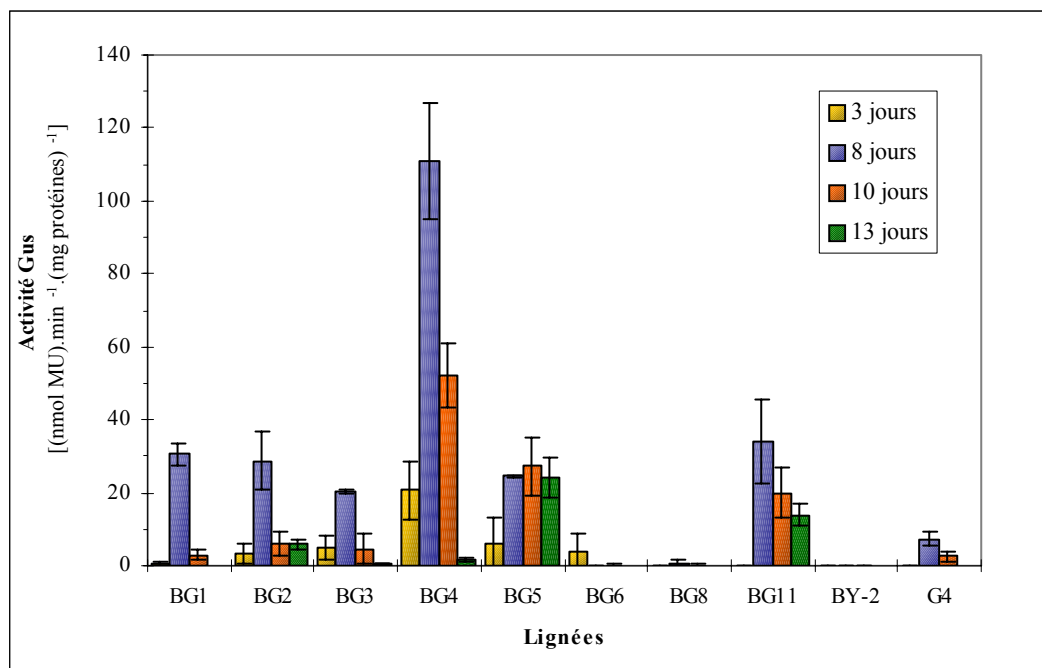
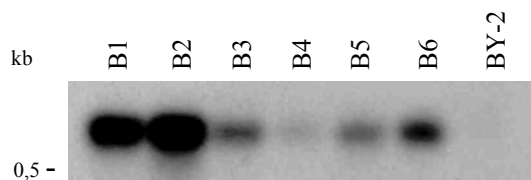
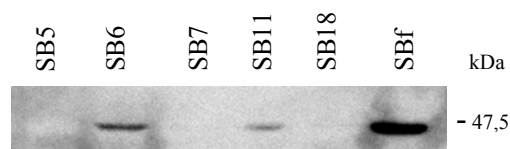
A**B****C****D**

Figure 17 Caractérisation de l'expression de Bax chez les lignées transformées. (A)

Suivi de l'activité Gus des lignées transformées avec la fusion Bax/Gus à différents temps suivant le repiquage. L'activité Gus a été quantifiée par une cinétique en présence du substrat MUG. Les données présentées correspondent à la moyenne \pm écart-type de trois expériences indépendantes. (B) Analyse de type Northern des lignées transformées avec Bax. L'ARN total ($10\mu\text{g}$) a été hybridé à la portion codante de *bax* murin. (C) Analyse de type Western des lignées transformées avec Bax. La protéine exogène a été détectée à l'aide d'un anticorps anti-Bax murin. Les astérisques indiquent des échantillons de cellules prélevés en août 2001; les autres ont été récoltés en février 2002. Un extrait de cellules 293 transfectées avec Bax murin a servi de contrôle positif. (D) Analyse Western des lignées transformées avec sGFP/Bax à l'aide d'un anticorps anti-GFP. Lignées transformées avec Bax/Gus (BG), Bax (B), Gus (G), sGFP/Bax (SB) ou non-transformée (BY-2).

La fluorescence émise par la GFP a aussi pu être observée pour ces trois mêmes lignées en microscopie (épifluorescence et confocale), la lignée SBf étant celle présentant la fluorescence la plus intense, ce qui confirme les résultats obtenus par l'analyse de type Western. Le patron de distribution observé est caractéristique d'une protéine cytoplasmique dans les cellules BY-2 (figure 18). Pour les autres lignées testées (SB5, SB7 et SB18), la fluorescence était très faible ou complètement imperceptible. Plusieurs séries d'observations avec ces lignées à différents temps (3-13 jours) suivant le repiquage ont toujours produit les mêmes résultats, c.-à-d. une distribution cytoplasmique chez les lignées présentant une fluorescence visible. Par contre, lorsque les cultures vieillissaient (environ à partir du 8^e jour suivant le repiquage), la fluorescence devenait de moins en moins intense, pour disparaître complètement 12-14 jours après le repiquage, alors que la viabilité des cellules diminuait (voir ci-dessous).

3.2.2.3 Cinétique de croissance

Afin de caractériser les lignées transformées et de vérifier si Bax ou la fusion Bax/Gus avaient une influence sur leur croissance, un suivi de la densité cellulaire des cultures (mesurée par le PCV, *packed cell volume*) à différents temps suivant l'ensemencement d'une même quantité de cellules a été effectué à l'été 2001. Les lignées exprimant Bax, Bax/Gus ou seulement le rapporteur Gus croissaient généralement à une vitesse similaire aux cellules non-transformées, entrant en phase exponentielle vers le 3^e jour suivant le transfert dans du milieu frais et atteignant presque un plateau vers le 8^e jour (figure 20). Parmi les résultats présentés, la lignée BG11 ne semble pas atteindre la même densité que les autres (la différence n'est pas significative), mais son patron de croissance est similaire à celui des autres lignées. Ce phénomène a aussi été observé chez quelques autres lignées. Ces cultures avaient généralement tendance à former des agrégats en milieu liquide mais mis à part cette caractéristique, elles semblaient se comporter normalement.

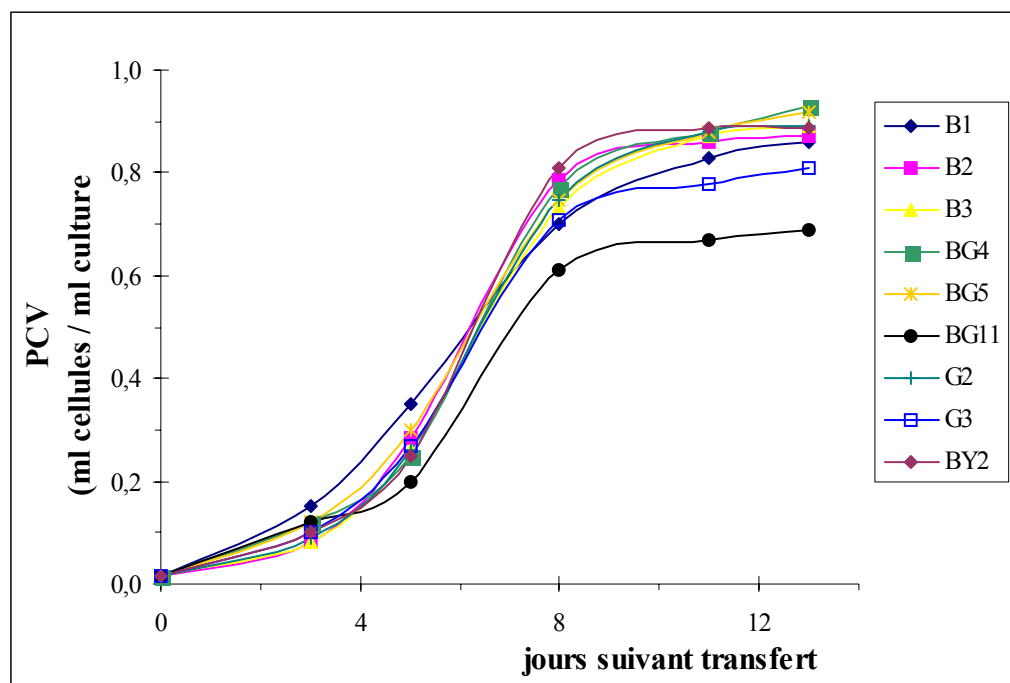


Figure 18 Cinétique de croissance des lignées transgéniques. La densité cellulaire a été mesurée par le PCV obtenu en centrifugeant 15 ml de culture cellulaire à différents temps suivant l'ensemencement d'une même quantité de cellules. Lignées transformées avec Bax (B), Bax/Gus (BG), Gus (G) ou non-transformée (BY-2). Les moyennes d'au moins deux expériences indépendantes sont présentées. Les incertitudes sur les données ont été omises pour plus de clarté.

3.2.2.4 Phénotype macroscopique

Les cultures exprimant constitutivement Bax ou les fusions Bax/Gus et sGFP/Bax avaient tendance à prendre une teinte grisâtre (généralement attribuée à l'oxydation de composés phénoliques qui survient dans une culture mal en point) plus rapidement que les témoins transformés avec le rapporteur Gus ou que les cellules non-transformées. En effet, ces cellules sont habituellement repiquées à tous les sept jours, mais peuvent quand même être maintenues au moins 13-14 jours dans le même milieu avant de commencer à présenter une teinte grisâtre perceptible. Par contre les lignées transformées pour exprimer Bax, Bax/Gus ou sGFP/Bax développaient généralement la teinte grisâtre plus rapidement, commençant à être perceptible 8-11 jours après l'ensemencement (figure 19). Il est aussi à noter qu'une certaine variabilité a été observée d'une semaine à l'autre. Par exemple, les cultures les plus grises d'une semaine n'étaient pas nécessairement les mêmes la semaine suivante. Par contre, des tendances générales ont été observées à long terme.

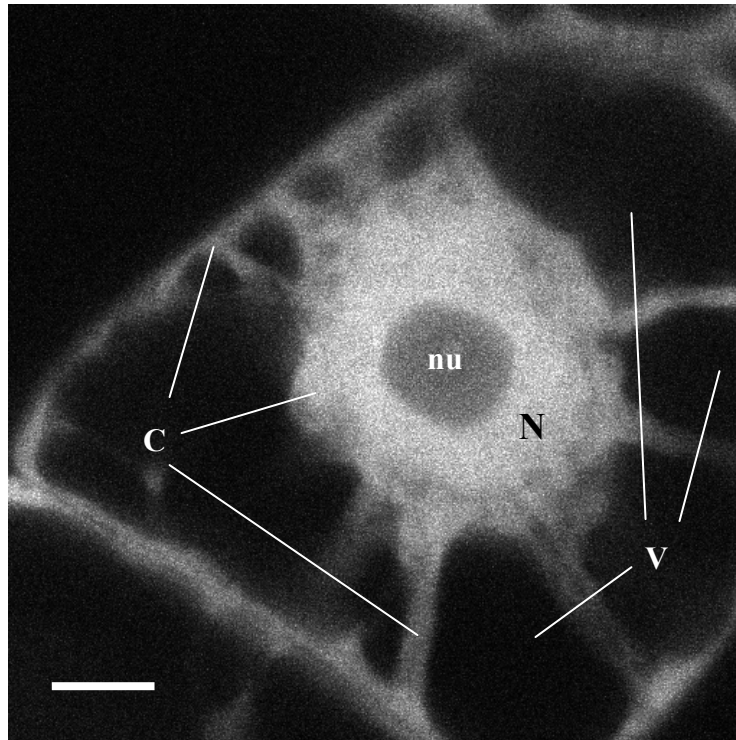


Figure 19 Localisation de la fusion sGFP/Bax chez les cellules BY-2. La fluorescence émise par la GFP chez la lignée SBf, 6 jours suivant le repiquage, a été enregistrée en microscopie confocale. Barre : 10 μ m. C, cytoplasme; N, noyau; nu, nucléole; V, vacuole.



Figure 20 Aspect des cultures transgéniques 13 jours suivant le repiquage. Lignées transformées exprimant Bax (B), Bax/Gus (BG), sGFP/Bax (SB), Gus (G) ou non-transformée (BY-2).

3.2.2.5 Quantification de la mort cellulaire

La viabilité des lignées cellulaires à différents temps suivant le repiquage a été déterminée à l'aide du colorant d'exclusion bleu d'Evan. La première méthode utilisée consistait simplement en un décompte du pourcentage de cellules mortes, qui apparaissent bleues en présence du colorant. À l'été 2001, la plupart des lignées exprimant Bax et Bax/Gus présentaient, à partir du 8^e jour suivant l'ensemencement, un taux de cellules mortes (généralement 30-45 %) supérieur aux témoins (cellules BY-2 non-transformées ou exprimant Gus) qui présentaient 10-15 % de mortalité (figure 21A). Beaucoup de débris cellulaires étaient présents dans les cultures les plus affectées, ce qui a rendu les comptes difficiles à pratiquer et explique en partie la plus grande variabilité des données pour ces cas.

Le pourcentage de mortalité des lignées sGFP/Bax a aussi été déterminé (à l'hiver 2002) pour des cultures de 12 jours, mais à l'aide d'une méthode spectrophotométrique utilisant le bleu d'Evan (voir section 2.11.2). Les lignées choisies (ainsi que la lignée B2) présentaient un taux de mortalité (25-45 %) plus élevé que les témoins non-transformés ou exprimant Gus (autour de 10 %) (figure 21B).

Ces résultats démontrent que Bax entraîne une mort prématurée des cellules dans ce système et que dans ces conditions, la fusion de Gus en C-terminal ou de la GFP en N-terminal de Bax ne semble pas avoir d'influence sur cet effet. Par ailleurs, les résultats de quantification de la mortalité obtenus avec les deux méthodes (microscopique et spectrophotométrique) sont similaires.

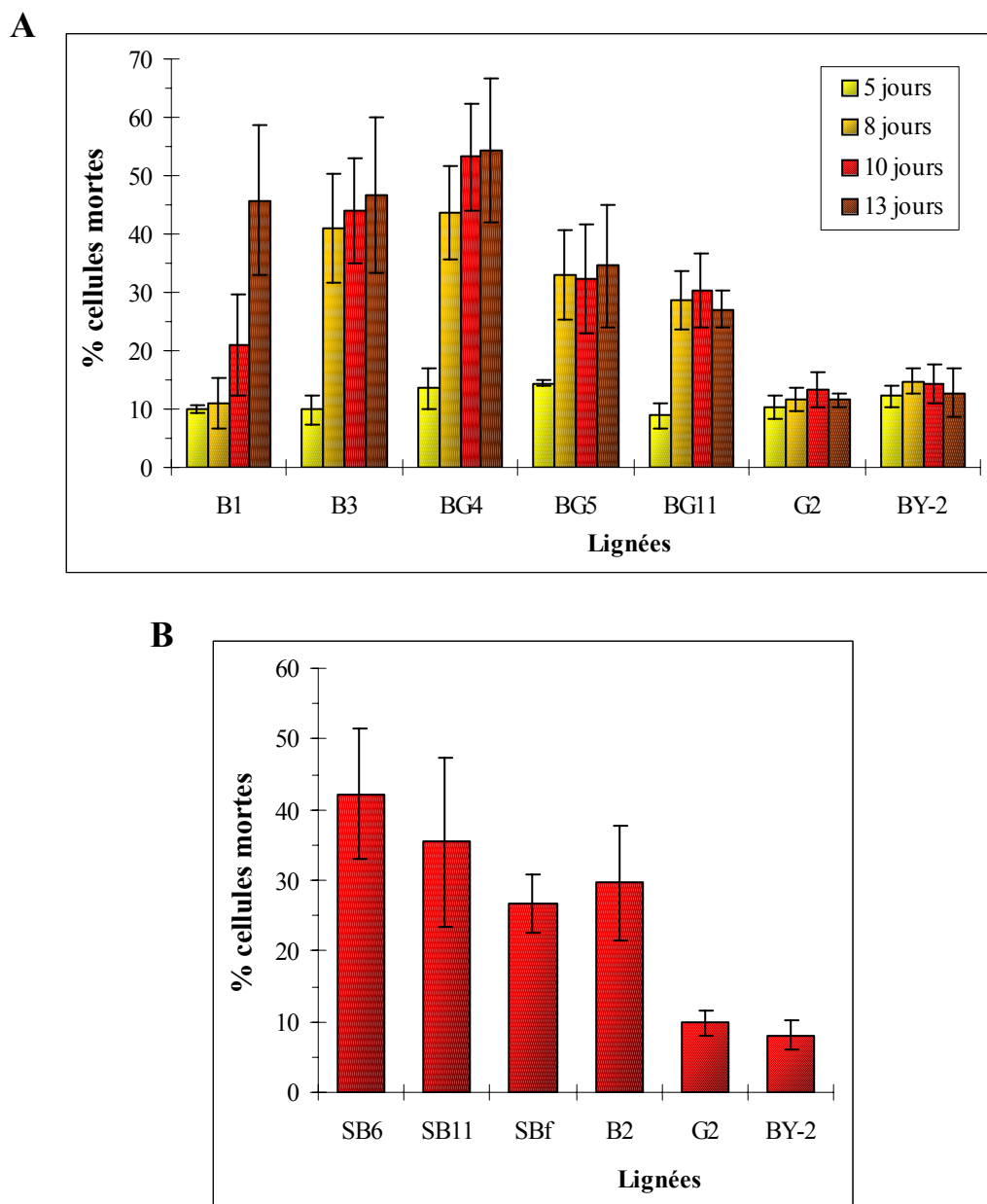


Figure 21 Évaluation du taux de mortalité chez les lignées transformées.

(A) Suivi de la mortalité de lignées exprimant Bax (B) ou Bax/Gus (BG) à différents temps après le repiquage. Le pourcentage de cellules mortes a été déterminé par la méthode microscopique avec le bleu d'Evan (voir section 2.11). (B) Taux de mortalité des lignées exprimant sGFP/Bax (SB) 12 jours suivant le repiquage déterminé par la méthode spectroscopique. Dans les deux cas, la moyenne \pm écart-type d'au moins trois expériences indépendantes est présentée. BY-2, lignée non-transformée; G, lignée exprimant Gus.

3.2.2.6 Morphologie cellulaire

Les cellules des lignées transformées ont été observées en microscopie (voir section 2.13) afin de caractériser les changements morphologiques survenant chez les cultures âgées. À 13 jours suivant le repiquage, la grande majorité des cellules des lignées témoins (lignée non-transformée ou exprimant Gus) avaient une morphologie normale, avec un noyau d'environ 20 µm de diamètre duquel partent plusieurs bras cytoplasmiques se prolongeant entre la vacuole et se rejoignant en périphérie (figure 22A-B). Par contre, chez les lignées exprimant Bax, Bax/Gus ou sGFP/Bax, une bonne proportion de cellules présentait typiquement un nombre réduit de bras cytoplasmiques et une grande vacuole confinant le noyau condensé (moins de 10 µm de diamètre) et le cytoplasme en périphérie alors que d'autres ne semblent plus avoir de cytoplasme (comme s'il s'agissait seulement d'une grande vacuole) et un noyau redevenu rond ou absent (figure 22C-F).

3.2.2.7 Fragmentation de l'ADN nucléaire

La fragmentation de l'ADN nucléaire, une caractéristique quasi universelle des cellules en PCD, a été vérifiée par test TUNEL chez des cultures de 12 jours. Les lignées exprimant constitutivement Bax ou la fusion Bax/Gus présentaient une proportion variable mais importante de noyaux marqués par la terminale transférase alors qu'un nombre réduit de noyaux ont été marqués, bien que faiblement, chez la lignée non-transformée (figure 23) ou chez des lignées exprimant uniquement Gus (non montré). L'intensité du marquage variait souvent beaucoup dans un même échantillon, ce qui laisse croire que l'ADN de tous les noyaux présentaient des degrés de fragmentation différents. Le fait que le marquage des noyaux du témoin positif, obtenu par un traitement de cellules saines avec de la DNase I, soit plus uniforme, supporte cette idée.

Ces résultats permettent d'associer la mort cellulaire prématurée observée chez les cultures exprimant Bax à une forme de PCD.

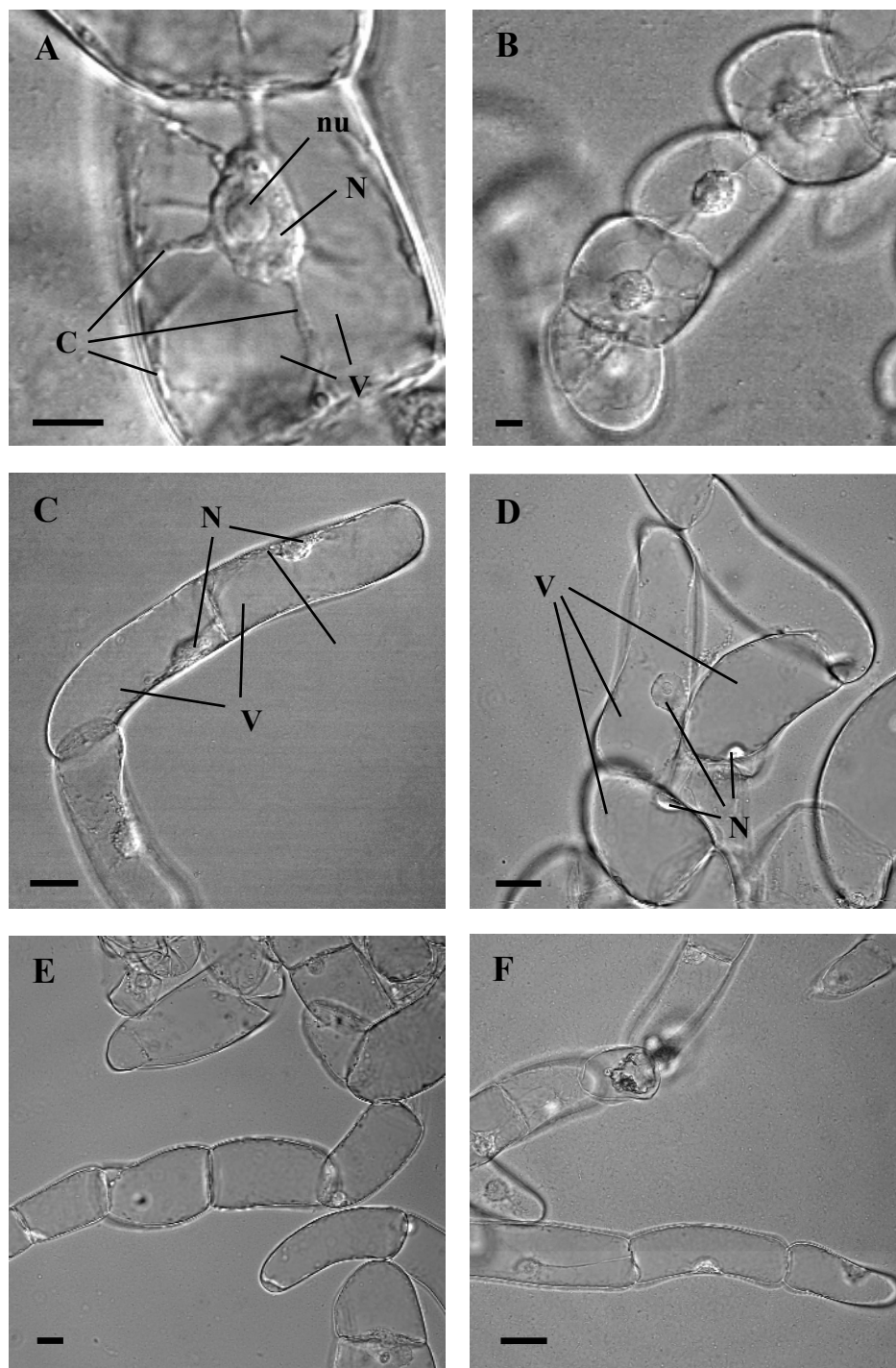


Figure 22 Morphologie cellulaire chez les cultures âgées. Les cellules ont été observées 13 jours suivant le repiquage. (A-B) Cellules saines chez les lignées BY-2 non-transformée (A) et G2 (B). (C-F) Cellules présentant des modifications morphologiques chez les lignées SB11 (C), BG5 (D), BG4 (E) et B2 (F). Dans tous les cas, la barre vaut 10 μm . C, cytoplasme; N, noyau; nu, nucléole; V, vacuole.

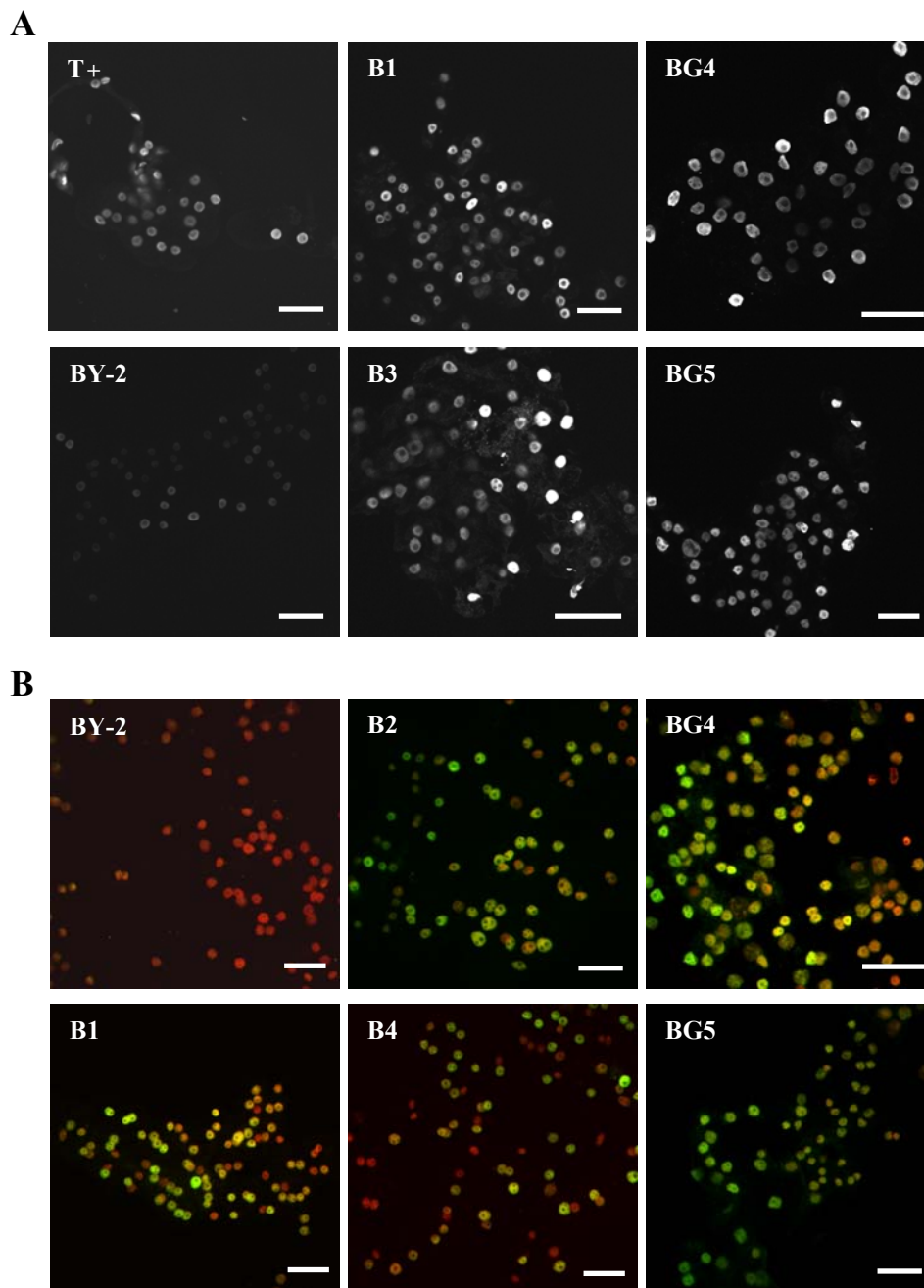


Figure 23 Fragmentation de l'ADN nucléaire chez les lignées exprimant Bax ou la fusion Bax/Gus. Les tests TUNEL utilisant des nucléotides marqués à la fluorescéine ont été effectués sur des cultures de 12 jours et les résultats analysés en microscopie confocale. (A) Noyaux marqués par la fluorescéine. Le témoin positif (T+) a été obtenu en traitant un échantillon de cellules non-transformées de 5 jours avec la DNase I. (L'essai a eu lieu en août 2001.) (B) Superposition des images de tous les noyaux, colorés avec le PI (en rouge), et de l'ADN fragmenté marqué par la fluorescéine (en vert). (L'essai a été effectué en octobre 2001.) Dans tous les cas, la barre vaut 50 μm . Lignées non-transformée (BY-2) ou transformées avec Bax (B) ou Bax/Gus (BG).

3.2.2.8 Mortalité dans du milieu sans sucrose

Les cellules utilisées ne faisant pas de photosynthèse, elles dépendent du sucrose du milieu de culture comme source de carbone. Pour tenter de déterminer si le stress dû à l'épuisement du milieu chez les cultures âgées contribue à déclencher la mort cellulaire prématurée des cellules exprimant Bax, des cultures de 4 jours ont été transférées dans du milieu BY-2 duquel le sucrose a été omis et le taux de mortalité a été évalué au moment du transfert et après 24, 48 et 72 h dans le milieu sans sucrose (figure 24).

Le pourcentage de cellules mortes au moment du transfert était similaire pour toutes les lignées testées, autour de 10 %. Après 24 h dans le milieu sans sucrose, les lignées exprimant Bax, Bax/Gus ou sGFP/Bax avaient déjà un taux de mortalité considérablement supérieur aux lignées exprimant uniquement Gus (environ 50-60 % vs 25 %) et un écart similaire a été observé après 48 h mais commençait à rétrécir à 72 h, alors que la mortalité des témoins accélérail. La morphologie cellulaire dans ces cultures a aussi été observée. Une grande proportion des cellules avait une grande vacuole prédominante repoussant un noyau condensé dans un coin de la cellule (non montré).

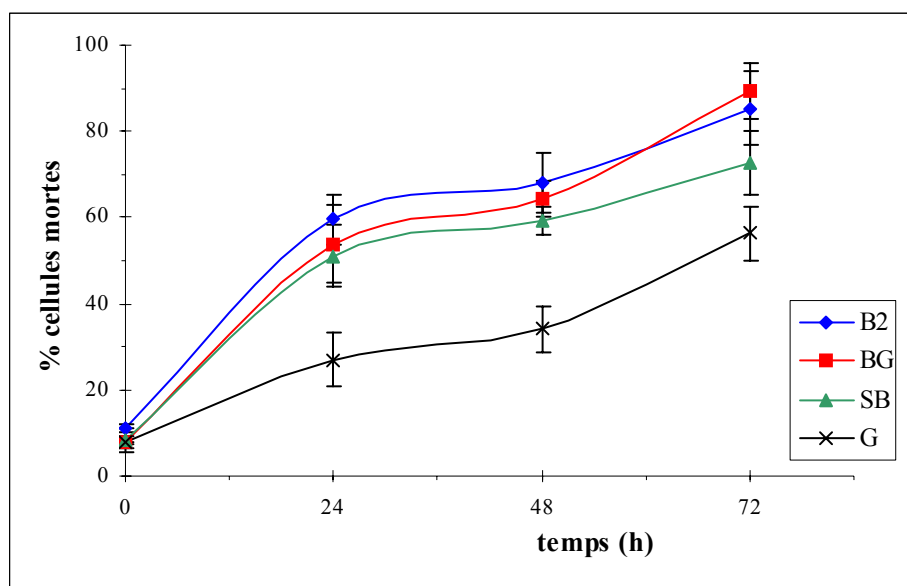


Figure 24 Suivi du taux de mortalité des lignées exprimant Bax seul ou en fusion dans du milieu dépourvu de sucrose. Des cultures de 4 jours ont été transférées dans du milieu sans sucrose et le taux de mortalité a été quantifié à l'aide de la méthode spectrophotométrique avec le bleu d'Evan. Les données des lignées d'un même groupe ont été rassemblées et chaque point correspond à la moyenne \pm écart-type de deux expériences indépendantes pour sur les lignées suivantes : B2; BG4 et BG5 (BG); SB6, SB11 et SBf (SB); G2 et G5 (G). Lignées transformées avec Bax (B) ou Bax/Gus (BG), sGFP/Bax (SB) ou Gus (G).

3.2.2.9 Lignées inductibles

Des cellules BY2 ont aussi été transformées à l'aide d'*Agrobacterium* dans le but d'obtenir des lignées stables ayant Bax, Bax/Gus ou Gus sous le contrôle d'une cassette d'expression inductible par la dexaméthasone, dans le but d'établir par la suite un système pour vérifier la capacité de BnBI-1 à inhiber la PCD induite par Bax chez les végétaux. Selon la procédure habituelle, pour chaque construction, une dizaine de transformants résistants à l'hygromycine ont été mis en culture liquide, toujours en présence de l'agent sélectif.

À ce moment, c'est-à-dire à la fin de l'été 2001, un test préliminaire d'induction a été effectué sur les lignées transformées avec le rapporteur Gus ou la fusion Bax/Gus. Une aliquote de culture cellulaire a été mis en présence de 5 ou 10 μM dexaméthasone (alors que l'intervalle de concentration utile est de 0,1-20 μM en culture liquide d'après McNellis *et al.*, 1998) et l'activité Gus a été évaluée qualitativement environ 24 h plus tard à l'aide du substrat X-Gluc. La plupart des lignées testées ne présentaient alors que peu ou pas d'activité détectable en absence de l'inducteur et une forte activité lorsque mises en présence de 5 ou 10 μM dexaméthasone (non montré).

Cependant, les travaux sur ces lignées n'ont repris qu'au début de 2002. Des dizaines d'essais impliquant des concentrations variant de 0,1-100 μM dexaméthasone pour des périodes de un à six jours ont été utilisées, mais en aucun cas Bax n'a été détecté par analyse de type Western. Beaucoup de tests de mortalité ont aussi été effectués lors de ces essais, mais il n'a pas été possible de démontrer de corrélation entre la présence de l'agent inducteur et un taux de mortalité accru (non montré). L'activité Gus n'était généralement plus détectable avec le substrat X-Gluc chez des lignées transformées avec Gus ou Bax/Gus induites avec 10 μM dexaméthasone. Par ailleurs, une autre équipe a publié entre temps la capacité d'AtBI-1 à inhiber la PCD induite par Bax dans un système pratiquement identique chez des plantules d'*Arabidopsis* (Kawai-Yamada *et al.*, 2001). Les travaux impliquant ces lignées ont alors été abandonnés.

Chapitre 4 Discussion

4.1 Les homologues végétaux de BI-1 sont très bien conservés structurellement et fonctionnellement

Étant l'un des rares régulateurs de l'apoptose animale ayant des homologues chez les végétaux, BI-1 représente une opportunité intéressante pour l'étude de la PCD végétale et de son évolution. Avec le clonage d'homologues de BI-1 de *Brassica napus* et de *Nicotiana tabacum* dans notre laboratoire (Bolduc *et al.*, 2003), l'opportunité de faire une analyse de séquence plus poussée se présentait. La similarité entre les séquences des BI-1 végétaux est très grande (de même qu'avec les séquences animales) et l'arbre phylogénétique obtenu supporte l'idée qu'il s'agit de vrais orthologues, avec une origine évolutive commune. De plus, la démonstration de la fonctionnalité de BI-1 végétaux chez des cellules animales a confirmé que les BI-1 des deux règnes peuvent exercer les mêmes fonctions.

Au moment où ces travaux ont été entrepris, la capacité des BI-1 végétaux à inhiber la PCD induite par Bax avait été démontrée seulement chez la levure (Kawai *et al.*, 1999; Sanchez *et al.*, 2000). Nous avons montré dans des cellules humaines 293 que BnBI-1 et NtBI-1 inhibent l'apoptose induite par Bax aussi bien que Bcl-2 (ce travail et Bolduc *et al.*, 2003). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Xu et Reed (1998) pour le BI-1 humain et suggèrent la conservation fonctionnelle de cette protéine, ce qui implique la conservation de sentiers de régulation de la PCD malgré l'absence de Bax chez les végétaux (d'autant plus que Bax et BI-1 ne semblent pas interagir l'un avec l'autre par contact direct; Xu et Reed, 1998). Par contre, une autre équipe a montré que l'expression d'AtBI-1 induisait l'apoptose chez les cellules humaines HT1080 et ont suggéré que ce phénomène était dû à une compétition avec le BI-1 animal (Yu *et al.*, 2002). Le contraste entre ces résultats et les nôtres pourraient bien seulement être dû au type cellulaire différent mais est néanmoins intrigant.

L'analyse des séquences protéiques déduites des homologues végétaux de BI-1 a permis de prédire plusieurs caractéristiques structurelles des BI-1 végétaux qui suggèrent différents mécanismes d'action. Premièrement, la recherche de motifs de localisation intracellulaire n'a pas permis de tirer de conclusions sans ambiguïté, mis à part qu'il s'agit d'une protéine

membranaire intégrale, dû à son hydrophobicité. Malgré la prédiction par différents algorithmes d'une association aux chloroplastes, plusieurs résultats expérimentaux ont démontré que ce n'est pas le cas. Dans des feuilles de tabac, des études de microscopie électronique ont montré que le NtBI-1 endogène n'est pas localisé aux chloroplastes (Bolduc et Brisson, non publié) alors que la fusion BnBI-1/GFP n'a pas été détectée dans les chloroplastes par microscopie confocale lors de l'infiltration d'*Agrobacterium* (Bolduc *et al.*, 2003). Plutôt, la fusion BnBI-1/GFP est localisée au niveau du RE et de l'enveloppe nucléaire chez des cellules BY-2 et la levure *S. cerevisiae* (Bolduc *et al.*, 2003). Cette localisation suggère que la queue C-terminale de résidus basiques est contributive à la rétention de cette protéine dans le réseau membranaire du RE et son extension périnucléaire.

La topologie au sein des membranes a ensuite été étudiée et a abouti à un modèle à 7 TM dont la validité repose sur une méthodologie basée sur un alignement de cinq séquences végétales et employant quatre algorithmes différents dont les prédictions ont été conciliées. La forte prédiction d'une orientation cytoplasmique de l'extrémité C-terminale relègue le N-terminus dans la lumière du RE. Il a pu être vérifié expérimentalement à l'aide d'une perméabilisation différentielle des membranes que le C-terminus d'une fusion BnBI-1-GFP est bien dans le cytosol de cellules BY-2 transformées (Bolduc *et al.*, 2003). La divergence observée dans la topologie entre les séquences végétales et animales (6 TM, avec le N-terminus dans le cytosol) n'est cependant peut-être pas significative étant donné le choix délibéré d'un nombre restreint de séquences distantes. Par contre, il est aussi plausible que l'extrémité N-terminale, un peu plus longue chez les végétaux, ait une fonction différente et/ou supplémentaire chez les plantes. Cette idée est supportée par l'existence d'autres homologues plus éloignés de BI-1 chez *Arabidopsis* dont l'extrémité N-terminale varie beaucoup par rapport aux séquences présentées ici. Ces protéines pourraient ainsi constituer une classe de régulateurs de la PCD végétale (Lam *et al.*, 2001), mais les fonctions de ces homologues restent à être déterminées; leur extrémité N-terminale variable pourrait alors s'avérer une piste de recherche intéressante.

Les propriétés structurelles déduites des BI-1 végétaux suggèrent aussi plusieurs mécanismes d'action. La présence de résidus chargés dans les TM, une caractéristique

défavorable (ce qui est d'ailleurs possiblement en partie responsable de la variabilité rencontrée lors de la détection des TM par différents programmes), est intrigante notamment dans le TM VII, où les charges sont réparties de manière à former une hélice amphiphatique. Il est plausible que ces charges puissent être impliquées dans des interactions directes avec d'autres protéines situées dans la membrane du RE ou bien positionnées dans l'intérieur hydrophile d'un canal ionique. Un modèle de la structure tridimensionnelle de BI-1 au sein des membranes pourrait possiblement révéler des caractéristiques supportant un mécanisme plutôt qu'un autre ou en suggérer un nouveau. Un tel modèle est par contre impossible à réaliser par comparaison de séquence, puisque très peu de structures de protéines membranaires ont été déterminées expérimentalement jusqu'à maintenant.

4.2 Bax déclenche prématurément la PCD chez des cellules en culture

Les mécanismes d'action de Bax chez les animaux sont relativement bien connus comparativement aux autres régulateurs de l'apoptose (voir section 1.2.3). Nous avons tenté de l'utiliser comme outil afin de mieux comprendre les sentiers de régulation de la PCD conservés chez les végétaux, notamment ceux pouvant être contrôlés par BI-1, dans le but éventuel d'élucider les mécanismes moléculaires impliquant BI-1 chez les végétaux.

Dans un premier temps, Bax a été exprimé dans des feuilles de tabac par infiltration d'*Agrobacterium*. Malgré les essais répétés et la vérification de la transformation dans ce système, un phénotype de mort relié à l'expression de Bax n'a pu être détecté par la méthode employée. Au contraire, Lacomme et Santa Cruz (1999) ont exprimé Bax avec un vecteur viral chez des plantes de tabac de génotype nn et qui ont obtenu une réponse similaire à la HR. La différence vient sans doute du moyen de transformation employé. Il est à noter que des plantes de génotype nn permettent la réplication du virus modifié qui se propage pour donner une expression systémique du transgène et finissent par présenter des symptômes tels que la chlorose, la déformation et l'arrêt de croissance (Donson *et al.*, 1991), suggérant que ce procédé implique un stress important chez la plante. Le vecteur viral portant seulement la GFP cause la HR chez les plantes de génotype NN et a permis de déterminer que l'expression est très forte dans certaines zones discrètes où une très grande

proportion des cellules semblent transformées (Lacomme et Santa Cruz, 1999). Notre système (c.-à-d. l'infiltration d'*Agrobacterium* et le promoteur CaMV 35S) ne semble pas permettre une expression assez forte dans un nombre suffisant de cellules pour causer des lésions locales dues à Bax.

La fusion GFP-Bax a été observée dans le cytoplasme dans deux types cellulaires de la feuille lors de l'infiltration. La dysfonction chloroplastique et la dégradation de la chlorophylle ont souvent été associées aux événements initiaux de la sénescence, mais Bax ne semble pas s'associer à cette organelle dans ce système. Par contre, la méthode employée ne permet pas d'exclure qu'une certaine proportion de Bax puisse être associée à d'autres organelles qui pourraient être des cibles pour l'action de Bax.

Par la suite, des lignées de cellules BY-2 exprimant Bax, seul ou en fusion, ont été établies. Au départ, nous ne croyons pas isoler de transformants stables exprimant Bax constitutivement sous le contrôle du CaMV 35S, mais des transformants résistants à l'agent sélectif se sont démarqués. L'intégration au génome et l'expression des transgènes ont été vérifiées et plusieurs lignées avec des caractéristiques différentes ont été utilisées lors des expériences. Malgré une vitesse de croissance et un aspect généralement similaires à la lignée non-transformée lorsque repiquées régulièrement, les lignées exprimant Bax devenaient grises plus rapidement en vieillissant et présentaient un taux de mort cellulaire accru. La morphologie cellulaire et la fragmentation de l'ADN confirment que la mort prématurée de ces cellules passe par un processus de PCD organisé et actif, similaire à celui qui survient lors de situations physiologiques.

Le fait que nous ayons pu isoler des transformants stables est probablement dû en partie au niveau d'expression fourni par le promoteur CaMV 35S. Cette idée est confortée par le phénotype des lignées transformées avec Bax seul ou en fusion, qui semblent normales lorsqu'elles sont maintenues dans des conditions optimales mais sont plus sensibles que les lignées témoins aux stress qui surviennent chez les cultures vieillissantes, comme l'augmentation de la densité cellulaire, l'accumulation de déchets métaboliques et l'appauvrissement du milieu de culture. Il a d'ailleurs été démontré à l'aide d'un milieu sans sucrose, qui cause à la fois un stress osmotique et la privation de source de carbone, que ce dernier facteur peut déclencher une PCD précipitée dont l'effet est encore plus

important chez les cellules exprimant Bax. Par ailleurs, il se peut aussi que des transformants avec un niveau d'expression plus grand (dû à la transformation par *Agrobacterium*) n'aient pu être sélectionnés.

Dans tous les cas, la morphologie des cellules mourantes ressemblait à celle décrite pour des cellules en autophagie, comme dans la plupart des cas bien connus de PCD chez les végétaux (voir section 1.3.1 et les références). Des plantules d'*Arabidopsis* exprimant Bax observées en microscopie électronique montrent aussi un cytoplasme rétréci en périphérie de la cellule (Kawai-Yamada *et al.*, 2001). Ces résultats sont aussi similaires à ceux obtenus dans notre laboratoire pour des cellules BY-2 exprimant un antisens de NtBI-1, qui meurent plus rapidement et sont plus sensibles à l'effet d'un milieu sans sucrose (Bolduc et Brisson, 2002). On peut donc croire que NtBI-1 et Bax agissent de manière antagoniste sur un même sentier régulant la survie et la mort et que ce sentier est impliqué dans la régulation de l'autophagie. Étant donné la localisation de BI-1 dans la membrane du RE et l'effet de Bax sur la régulation de l'apoptose par la modulation du Ca^{2+} du RE (voir section 1.2.3.4), il est tentant de supposer que BI-1 pourrait exercer son action en modulant des flux de Ca^{2+} au niveau du RE. Cette activité pourrait être directe, par exemple par la formation d'un canal ionique (seul ou en collaborant avec d'autres protéines), ou indirecte, en agissant sur des sentiers de régulation de canaux à Ca^{2+} de la membrane du RE.

Si la méthodologie de transformation stable a permis d'observer la PCD induite par Bax chez des cellules de tabac, elle est responsable de plusieurs situations indésirables dans un modèle parfait. Ainsi, il semble que les lignées de cellules BY-2 transformées aient tendance à long terme à « perdre » les transgènes intégrés à leur génome, une prédisposition sans doute accentuée par nos transgènes (ce qui a d'ailleurs été le cas pour les lignées exprimant un antisens de NtBI-1). La durée de vie du système est donc limitée, ce qui peut être un inconvénient majeur étant donné le temps nécessaire à l'établissement des lignées transformées et à leur caractérisation. De plus, un modèle provoquant une réponse plus drastique serait plus approprié à la caractérisation fonctionnelle d'inhibiteurs de la PCD. C'était le but des lignées inductibles par la dexaméthasone mais il semble que leur durée de vie efficace soit encore plus courte (peut-être à cause du vecteur lui-même) malgré la sélection continue par l'hygromycine, réputée pour être plus stricte que celle par la

kanamycine utilisée pour les lignées dont l'expression est constitutive. Chez ces dernières, l'utilisation d'un milieu sans sucrose a quand même permis d'obtenir une réponse accrue et rapide qui pourrait être désirable ou même nécessaire, mais on peut suspecter que d'autres sentiers que ceux impliquant Bax (et BI-1) soient influencés du même coup.

Conclusion

1) La PCD : des processus animaux et végétaux complexes

Le contrôle de la PCD chez les animaux est très complexe (voir section 1.2). Plusieurs sentiers et régulateurs, qui ne sont pas nécessairement mutuellement exclusifs, agissent de concert ou de manière antagoniste. Chez les végétaux, il n'y a pas encore eu émergence de paradigmes quant aux régulateurs et effecteurs de la PCD, comme c'est le cas pour l'apoptose. Mais on peut suspecter que BI-1 fasse partie d'un mécanisme de régulation de la mort chez les végétaux. L'analyse approfondie de son mode d'action pourrait bien mener à l'identification de sentiers de contrôle de la PCD qui ne sont pas nécessairement exclusifs aux plantes. Le mode d'action de Bax chez les animaux, bien que très complexe, peut aussi donner de précieux indices sur le contrôle de la PCD végétale, notamment en ce qui concerne son rôle dans la régulation des flux de Ca^{2+} . De plus, puisque la mort cellulaire provoquée par l'expression ectopique de Bax chez les végétaux induit une mort de type autophagique (voir sections 3.2.2 et 4.2), les données disponibles à ce sujet chez les animaux ne doivent pas être sous-estimées.

2) L'évolution de la PCD et les végétaux

L'avantage évolutif conféré par la PCD est évident. Comme il devient de plus en plus clair que la PCD eucaryote est aussi ancienne que l'acquisition des mitochondries (voir à ce sujet l'article très intéressant d'Ameisen, 2002), il semble aussi évident que des mécanismes ancestraux de contrôle de la mort sont encore présents chez les mammifères et les plantes. Le fait que Bax déclenche une PCD de type autophagique chez les végétaux supporte l'idée d'un sentier de régulation ancien et conservé et suggère par ailleurs que

l'apoptose est un raffinement de la PCD autophagique ancestrale. Les régulateurs et effecteurs de la PCD qui agissent indépendamment des caspases chez les animaux et qui sont bien conservés chez plusieurs organismes très distants semblent donc des candidats intéressants pour l'étude de la PCD, notamment chez les végétaux.

Si l'apoptose a attiré beaucoup l'attention et lancé la recherche sur la PCD, on doit maintenant reconnaître que malgré la conservation fonctionnelle de la PCD chez pratiquement toutes les formes de vie, l'apoptose proprement dit n'est observée que chez les animaux. Chez les autres organismes, la PCD montre généralement des caractéristiques différentes, autophagiques, aussi observées dans certains cas chez les animaux. Cette forme de mort ancestrale est donc possiblement un des facteurs ayant servi de tremplin à l'évolution vers les organismes multicellulaires qui en dépendent.

Références

- Abeliovich, H., & Klionsky, D.J. (2001) Autophagy in yeast : Mechanistic insights and physiological function. *Microbiol Mol Biol Rev* 65: 463-79.
- Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D.G., Heuser, J.E., Wang, X., & Akey, C.W. (2002) Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* 9: 423-32.
- Adams, J.M., & Cory, S. (2001) Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci* 26: 61-6.
- Adrain, C., & Martin, S.J. (2001) The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci* 26: 390-7.
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., & Yuan, J. (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87: 171.
- Alvarez, M.E. (2000) Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Mol Biol* 44: 429-42.
- Ameisen, J.C. (2002) On the origin, evolution, and nature of programmed cell death : a timeline of four billion years. *Cell Death Differ* 9: 367-93.
- Antonsson, B. (2001) Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family "killer-proteins" and their victim the mitochondrion. *Cell Tissue Res* 306: 347-61.
- Aoyama, T., & Chua, N.H. (1997) A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant J* 11: 605-12.
- Aravind, L., Dixit, V.M., & Koonin, E.V. (1999) The domains of death: evolution of the apoptosis machinery. *Trends Biochem* 24: 47-53.
- Arnaudeau, S., Frieden, M., Nakamura, K., Castelbou, C., Michalak, M., & Demaurex, N. (2002) Calreticulin differentially modulates calcium uptake and release in the endoplasmic reticulum and mitochondria. *J Biol Chem* 277: 46696-705.
- Ashkenazi, A., & Dixit, V.M. (1997) Death receptors : signaling and modulation. *Science* 281: 1305-8.
- Aubert, S., Gout, E., Bligny, R., Marty-Mazars, D., Barrieu, F., Alabouvette, J., Marty, F., & Douce, R. (1996) Ultrastructural and biochemical characterization of autophagy in higher plant cells subjected to carbon deprivation : control by the supply of mitochondria with respiratory substrates. *J Cell Biol* 133: 1251-63.
- Baetu, T.M., & Hiscott, J. (2002) On the TRAIL to apoptosis. *Cytokine Growth F R* 13: 199-207.

- Balk, J., Chew, S.K., Leaver, C.J., & McCabe, P.F. (2003) The intermembrane space of plant mitochondria contains a DNase activity that may be involved in programmed cell death. *Plant J* 34: 573-83.
- Bannai, H., Tamada, Y., Maruyama, O., Nakai, K., & Miyano, S. (2002) Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. *Bioinformatics* 18: 298-305.
- Basanez, G., Nechushtan, A., Drozhinin, O., Chanturiya, A., Choe, E., Tutt, S., Wood, K.A., Hsu, Y., Zimmerberg, J., & Youle, R.J. (1999) Bax, but not Bcl-xL, decreases the lifetime of planar phospholipid bilayer membranes at subnanomolar concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 5492-7.
- Beers, E.P., Woffenden, B.J., & Zhao, C. (2000) Plant proteolytic enzymes: possible roles during programmed cell death. *Plant Mol Biol* 44: 399-415.
- Bentires-Alj, M., Dejardin, E., Viatour, P., Van Lint, C., Froesch, B., Reed, J.C., Merville, M.P., & Bours, V. (2001) Inhibition of the NF-kappa B transcription factor increases Bax expression in cancer cell lines. *Oncogene* 20: 2805-13.
- Blanchard, H., Kodandapani, L., Mittl, P.R.E., Di Marco, S., Krebs, J.F., Wu, J.C., Tomaselli, K.J., & Grütter, M.G. (1999) The three-dimensional structure of caspase-8: an initiator enzyme in apoptosis. *Structure* 7: 1125-33.
- Boise, L.H., Minn, A.J., Noël, P.J., June, C.H., Accavitti, M.A., Lindsten, T., & Thompson, C.B. (1995) CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* 3: 87-98.
- Boldin, M.P., Varfolomeev, E.E., Pancer, Z., Mett, I.L., Camonis, J.H., & Wallach, D. (1995) A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem* 270: 7795-8.
- Bolduc, N., & Brisson, L.F. (2002) Antisense down regulation of NtBI-1 in tobacco BY-2 cells induces accelerated cell death upon carbon starvation. *FEBS Lett* 532: 111-4.
- Bolduc, N., Ouellet, M., Pitre, F., & Brisson, L.F. (2003) Molecular characterization of two plant BI-1 homologues which suppress Bax-induced apoptosis in human 293 cells. *Planta* 216: 377-86.
- Borner, C. (2003) The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol* 39: 615-47.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54.
- Breckenridge, D.G., Nguyen, M., Kuppig, S., Reth, M., & Shore, G.C. (2002) The procaspase-8 isoform, procaspase-8L, recruited to the BAP31 complex at the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 4331-6.

- Brenner, C., Cadiou, H., Vieira, H.L., Zamzami, N., Marzo, I., Xie, Z., Leber, B., Andrews, D., Duclohier, H., Reed, J.C., & Kroemer, G. (2000) Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator. *Oncogene* 19: 329-36.
- Buckner, B., Janick-Buckner, D., Gray, J., & Johal, G.S. (1998) Cell-death mechanisms in maize. *Trends Plant Sci* 3: 218-23.
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., & Wang, X. (1999) Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Biol* 15: 269-90.
- Buendia, B., Santa-Maria, A., & Courvalin, J.C. (1999) Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis. *J Cell Sci* 112: 1743-53.
- Bursch, W., Ellinger, A., Gerner, C., Fröhwein, U., & Schulte-Hermann, R. (2000) Programmed cell death - apoptosis, autophagic PCD, or others? *Ann NY Acad Sci* 926: 1-12.
- Byun, Y., Chen, F., Chang, R., Trivedi, M., Green, K.J., & Cryns, V.L. (2001) Caspase cleavage of vimentin disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis. *Cell Death Differ* 8: 443-50.
- Candé, C., Cohen, I., Daugas, E., Ravagnan, L., Larochette, N., Zamzami, N., & Kroemer, G. (2002) Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie* 84: 215-22.
- Chandel, N.S., Schumacker, P.T., & Arch, R.H. (2001) Reactive oxygen species are downstream products of TRAF-mediated signal transduction. *J Biol Chem* 276: 42728-36.
- Chang, H.Y., & Yang, X. (2000) Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 821-46.
- Chen, C., Edelstein, L.C., & Gélinas, C. (2000) The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L). *Mol Cell Biol* 20: 2687-95.
- Chen, J.M., Rawlings, N.D., Stevens, R.A., & Barrett, A.J. (1998) Identification of the active site of legumain links it to caspases, clostripain and gingipains in a new clan of cysteine endopeptidases. *FEBS Lett* 441: 361-5.
- Cheng, E.H., Kirsch, D.G., Clem, R.J., Ravi, R., Kastan, M.B., Bedi, A., Ueno, K., & Hardwick, J.M. (1997) Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* 278: 1966-8.
- Chou, J.J., Li, H., Salvesen, G.S., Yuan, J., & Wagner, G. (1999) Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signaling. *Cell* 96: 615-24.

- Chou, K.-C., Tomaselli, A.G., & Henrikson, R.L. (2000) Prediction of the tertiary structure of a caspase-9/inhibitor complex. *FEBS Lett* 470: 249-56.
- Cleary, M.L., Smith, S.D., & Sklar, J. (1986) Cloning and structural analysis of cDNA for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14:18) translocation. *Cell* 47: 19-28.
- Clem, R.J., Cheng, E.H., Karp, C.L., Kirsch, D.G., Ueno, K., Takahashi, A., Kastan, M.B., Griffin, D.E., Earnshaw, W.C., Veluona, M.A., & Hardwick, J.M. (1998) Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 554-9.
- Conradt, B., & Horvitz, H.R. (1999) The TRA-1A sex determination protein of *C. elegans* regulates sexually dimorphic cell deaths by repressing the *egl-1* cell death activator gene. *Cell* 98: 317-27.
- Creagh, E.M., & Martin, S.J. (2001) Caspases : cellular demolition experts. *Biochemical Society Transactions* 29, part 6: 696-702.
- Csordas, G., Thomas, A.P., & Hajnoczky, G. (1999) Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria. *EMBO* 18: 96-108.
- Dangl, J.L., & Jones, J.D.G. (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411: 826-33.
- Danon, A., & Gallois, P. (1998) UV-C radiation induces apoptotic-like changes in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 437: 131-6.
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., & Greenberg, M.E. (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91: 231-41.
- Datta, S.R., Katsov, A., Hu, L., Petros, A., Fesik, S.W., Yaffe, M.B., & Greenberg, M.E. (2000) 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol Cell* 6: 41-51.
- Delledonne, M., Murgia, I., Ederle, D., Sbicego, P.F., Biondani, A., Polverari, A., & Lamb, C. (2002) Reactive oxygen intermediates modulate nitric oxide signaling in the plant hypersensitive disease-resistance response. *Plant Physiol Biochem* 40: 605-10.
- Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A., & Lamb, C. (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 13454-9.
- Demaurex, N., & Distelhorst, C. (2003) Apoptosis - the calcium connection. *Science* 300: 65-7.

- Denisov, A.Y., Madiraju, M.S., Chen, G., Khadir, A., Beuparlant, P., Attardo, G., Shore, G.C., & Gehring, K. (2003) Solution structure of human BCL-w: modulation of ligand binding by the C-terminal helix. *J Biol Chem* 278: 21124-8.
- Desagher, S., & Martinou, J.C. (2000) Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 10: 369-77.
- Desagher, S., Osen-Sand, A., Montessuit, S., Magnenat, E., Vilbois, F., Hochmann, A., Journot, L., Antonsson, B., & Martinou, J.C. (2001) Phosphorylation of bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8. *Mol Cell* 8: 601-11.
- Desagher, S., Osen-Sand, A., Nichols, A., Eskes, R., Montessuit, S., Lauper, S., Maundrell, K., Antonsson, B., & Martinou, J.C. (1999) Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome *c* release during apoptosis. *J Cell Biol* 144: 891-901.
- Desikan, R., Reynolds, A., Hancock, J.T., & Neill, S.J. (1998) Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defence gene expression in *Arabidopsis* suspension cultures. *Biochem J* 330: 115-20.
- Dickman, M.B., Park, Y.K., Oltersdorf, T., Li, W., Clemente, T., & French, R. (2001) Abrogation of disease development in plants expressing animal antiapoptotic genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 6957-62.
- Dietrich, R.A., Richberg, M.H., Schmidt, R., Dean, C., & Dangl, J.L. (1997) A novel zinc finger protein is encoded by the *Arabidopsis* LSD1 gene and functions as a negative regulator of plant cell death. *Cell* 88: 685-94.
- Dinesh-Kumar, S.P., Tham, W.-H., & Baker, B. (2000) Structure-function analysis of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 14789-94.
- Distelhorst, C.W. (2002) Recent insights into the mechanism of glucocorticosteroid-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 9: 6-19.
- Doelling, J.H., Walker, J.M., Friedman, E.M., Thompson, A.R., & Vierstra, R.D. (2002) The APG8/12-activating enzyme APG7 is required for proper nutrient recycling and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 277: 33105-14.
- Donson, J., Kearney, C.M., Hilf, M.E., & Dawson, W.O. (1991) Systemic expression of a bacterial gene by a tobacco mosaic virus-based vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 7204-8.
- Doyle, J.J., & Doyle, J.L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissues. *Focus* 12: 13-5.
- Drew, M.C., He, C.-J., & Morgan, P.W. (2000) Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. *Trends Plant Sci* 5: 123-7.

- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., & Wang, X. (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome *c*-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102: 33-42.
- Duke, R.C., Ojcius, D.M., & Young, J.D. (1996) Cell suicide in health and disease. *Sci Am* 275: 80-7.
- Earnshaw, W.C., Martins, L.M., & Kaufmann, S.H. (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68: 383-424.
- Ellis, H.M., & Horvitz, H.R. (1986) Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44: 817-29.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., & von Heijne, G. (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* 300: 1005-16.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., & von Heijne, G. (1999) ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci* 8: 978-84.
- Erickson, F.L., Holzberg, S., Calderon-Urrea, A., Handley, V., Axtell, M., Corr, C., & Baker, B. (1999) The helicase domain of the TMV replicase proteins induces the N-mediated defence response in tobacco. *Plant J* 18: 67-75.
- Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B., & Martinou, J.C. (2000) Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* 20: 929-35.
- Esposti, M.D. (2002) Sequence and functional similarities between pro-apoptotic Bid and plant lipid transfer proteins. *Biochim Biophys Acta* 1553: 331-40.
- Esposti, M.D., & Dive, C. (2003) Mitochondrial membrane permeabilisation by Bax/Bak. *Biochem Biophys Res Commun* 304: 455-61.
- Esposti, M.D., Erler, J.T., Hickman, J.A., & Dive, C. (2001) Bid, a widely expressed proapoptotic protein of the Bcl-2 family, displays lipid transfer activity. *Mol Cell Biol* 21: 7268-76.
- Fath, A., Bethke, P., Beligni, V., & Jones, R. (2002) Active oxygen and cell death in cereal aleurone cells. *J Exp Bot* 53: 1273-82.
- Fath, A., Bethke, P., Lonsdale, J., Meza-Romero, R., & Jones, R. (2000) Programmed cell death in cereal aleurone. *Plant Mol Biol* 44: 255-66.

- Foyouzi-Youssefi, R., Arnaudeau, S., Borner, C., Kelley, W.L., Tschopp, J., Lew, D.P., Demareux, N., & Krause, K.H. (2000) Bcl-2 decreases the free Ca^{2+} concentration within the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 5723-8.
- Fukuda, H. (2000) Programmed cell death of tracheary elements as a paradigm in plants. *Plant Mol Biol* 44: 245-53.
- Gallois, P., Makishima, T., Hecht, V., Despres, B., Laudie, M., Nishimoto, T., & Cooke, R. (1997) An *Arabidopsis thaliana* cDNA complementing a hamster apoptosis suppressor mutant. *Plant J* 11: 1325-31.
- Garg, A.K., & Aggarwal, B.B. (2002) Reactive oxygen intermediates in TNF signaling. *Mol Immunol* 39: 509-17.
- Germain, M., Mathai, J.P., & Shore, G.C. (2002) BH-3-only BIK functions at the endoplasmic reticulum to stimulate cytochrome *c* release from mitochondria. *J Biol Chem* 277: 18053-60.
- Germain, M., & Shore, G.C. (2003) Cellular distribution of Bcl-2 family proteins. *Sci STKE* 2003: pe10.
- Gogvadze, V., Robertson, J.D., Zhivotovsky, B., & Orrenius, S. (2001) Cytochrome *c* release occurs via Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent mechanisms that are regulated by Bax. *J Biol Chem* 276: 19066-71.
- Griffiths, G.J., Dubrez, L., Morgan, C.P., Jones, N.A., Whitehouse, J., Corfe, B.M., Dive, C., & Hickman, J.A. (1999) Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak *in vivo* precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol* 144: 903-14.
- Groover, A., & Jones, A.M. (1997) Programmed cell death of plant tracheary elements differentiating *in vitro*. *Protoplasma* 196: 197-211.
- Gross, A., McDonnell, J.M., & Korsmeyer, S.J. (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13: 1899-911.
- Gross, A., Pilcher, K., Blachly-Dyson, E., Basso, E., Jockel, J., Bassik, M.C., Korsmeyer, S.J., & Forte, M. (2000) Biochemical and genetic analysis of the mitochondrial response of yeast to BAX and BCL-X(L). *Mol Cell Biol* 20: 3125-36.
- Grumont, R.J., Rourke, I.J., & Gerondakis, S. (1999) Rel-dependent induction of A1 transcription is required to protect B cells from antigen receptor ligation-induced apoptosis. *Genes Dev* 13: 400-11.
- Grütter, M.G. (2000) Caspases : key players in programmed cell death. *Curr Opin Struct Biol* 10: 649-55.

- Gupta, S. (2002) A decision between life and death during TNF- α -induced signaling. *J Clin Immunol* 22: 185-94.
- Haldar, S., Jena, N., & Croce, C.M. (1995) Inactivation of Bcl-2 by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 4507-11.
- Hammond, E.M., Brunet, C.L., Johnson, G.D., Parkhill, J., Milner, A.E., Brady, G., Gregory, C.D., & Grand, R.J.A. (1998) Homology between a human apoptosis specific protein and the product of APG5, a gene involved in autophagy in yeast. *FEBS Lett* 425: 391-5.
- Hanada, M., Aime-Sempe, C., Sato, T., & Reed, J.C. (1995) Structure-function analysis of Bcl-2 protein. Identification of conserved domains important for homodimerization with Bcl-2 and heterodimerization with Bax. *J Biol Chem* 270: 11962-9.
- Hanaoka, H., Noda, T., Shirano, Y., Kato, T., Hayashi, H., Shibata, D., Tabata, S., & Ohsumi, Y. (2002) Leaf senescence and starvation-induced chlorosis are accelerated by the disruption of an Arabidopsis autophagy gene. *Plant Physiol* 129: 1181-93.
- Hancock, J.T., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R.D., & Neill, S.J. (2002) Cell signalling following plant/pathogen interactions involves the generation of reactive oxygen and reactive nitrogen species. *Plant Physiol Biochem* 40: 611-7.
- Harada, H., Becknell, B., Wilm, M., Mann, M., Huang, L.J., Taylor, S.S., Scott, J.D., & Korsmeyer, S.J. (1999) Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A. *Mol Cell* 3: 413-22.
- Hardwick, J.M., & Bellows, D.S. (2003) Viral versus cellular BCL-2 proteins. *Cell Death Differ* 10 Suppl 1: S68-76.
- Harris, M.H., Vander Heiden, M.G., Kron, S.J., & Thompson, C.B. (2000) Role of oxidative phosphorylation in Bax toxicity. *Mol Cell Biol* 20: 3590-6.
- Heath, M.C. (2000) Hypersensitive response-related death. *Plant Mol Biol* 44: 321-34.
- Hedgecock, E.M., Sulston, J.E., & Thomson, J.N. (1983) Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* 220: 1277-9.
- Hegde, R., Srinivasula, S.M., Zhang, Z., Wassell, R., Mukattash, R., Cilenti, L., DuBois, G., Lazebnik, Y., Zervos, A.S., Fernandes-Alnemri, T., & Alnemri, E.S. (2002) Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem* 277: 432-8.
- Hengartner, M.O., & Horvitz, H.R. (1994) Activation of *C. elegans* cell death protein CED-9 by an amino-acid substitution in a domain conserved in Bcl-2. *Nature* 369: 318-20.

- Hinds, M.G., Lackmann, M., Skea, G.L., Harrison, P.J., Huang, D.C., & Day, C.L. (2003) The structure of Bcl-w reveals a role for the C-terminal residues in modulating biological activity. *EMBO J* 22: 1497-507.
- Hirokawa, T., Boon-Chieng, S., & Mitaku, S. (1998) SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* 14: 378-9.
- Hockenbery, D.M., Oltvai, Z.N., Yin, X.M., Milliman, C.L., & Korsmeyer, S.J. (1993) Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75: 241-51.
- Hoeberichts, F.A., & Woltering, E.J. (2002) Multiple mediators of plant programmed cell death: interplay of conserved cell death mechanisms and plant-specific regulators. *Bioessays* 25: 24-57.
- Hofmann, K., Bucher, P., & Tschopp, J. (1997) The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem Sci* 22: 155-6.
- Hsu, Y.T., & Youle, R.J. (1997) Nonionic detergents induce dimerization among members of the Bcl-2 family. *J Biol Chem* 272: 13829-34.
- Hsu, Y.T., & Youle, R.J. (1998) Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. *J Biol Chem* 273: 10777-83.
- Huang, Q., Petros, A.M., Virgin, H.W., Fesik, S.W., & Olejniczak, E.T. (2002) Solution structure of a Bcl-2 homolog from Kaposi sarcoma virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 3428-33.
- Hückelhoven, R., Dechert, C., Trujillo, M., & Kogel, K.H. (2001) Differential expression of putative cell death regulator genes in near-isogenic, resistant and susceptible barley lines during interaction with the powdery mildew fungus. *Plant Mol Biol* 47: 739-48.
- Ink, B., Zornig, M., Baum, B., Hajibagheri, N., James, C., Chittenden, T., & Evan, G. (1997) Human Bak induces cell death in *Schizosaccharomyces pombe* with morphological changes similar to those with apoptosis in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 17: 2468-74.
- Ito, J., & Fukuda, H. (2002) ZEN1 is a key enzyme in the degradation of nuclear DNA during programmed cell death of tracheary elements. *Plant Cell* 14: 3201-11.
- Jefferson, R.A. (1987) Assaying Chimeric Genes in Plants: The GUS Gene Fusion System. *Plant Mol Biol Rep* 5: 387-405.
- Jones, A.M. (2001) Programmed cell death in development and defense. *Plant Physiol* 125: 94-7.

- Jurgensmeier, J.M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D., & Reed, J.C. (1998) Bax directly induces release of cytochrome *c* from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 4997-5002.
- Kaufmann, S.H., & Hengartner, M.O. (2001) Programmed cell death : alive and well in the new millenium. *Trends Cell Biol* 11: 525-34.
- Kaufmann, T., Schlipf, S., Sanz, J., Neubert, K., Stein, R., & Borner, C. (2003) Characterization of the signal that directs Bcl-x(L), but not Bcl-2, to the mitochondrial outer membrane. *J Cell Biol* 160: 53-64.
- Kawai, M., Pan, L., Reed, J.C., & Uchimiya, H. (1999) Evolutionally conserved plant homologue of the Bax inhibitor-1 (BI-1) gene capable of suppressing Bax-induced cell death in yeast. *FEBS Lett* 464: 143-7.
- Kawai-Yamada, M., Jin, L., Yoshinaga, K., Hirata, A., & Uchimiya, H. (2001) Mammalian Bax-induced plant cell death can be down-regulated by overexpression of *Arabidopsis* Bax Inhibitor-1 (AtBI-1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 12295-300.
- Kawasaki, T., Henmi, K., Ono, E., Hatakeyama, S., Iwano, M., Satoh, H., & Shimamoto, K. (1999) The small GTP-binding protein Rac is a regulator of cell death in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 10922-6.
- Kelleher, D.J., & Gilmore, R. (1997) DAD1, the defender against apoptotic cell death, is a subunit of the mammalian oligosaccharyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 4994-9.
- Kerr, J.F. (2002) History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 181-182: 471-4.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., & Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-57.
- Kim, J., & Klionsky, D.J. (2000) Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. *Annu Rev Biochem* 69: 303-42.
- Kim, M., Ahn, J.W., Jin, U.H., Choi, D., Paek, K.H., & Pai, H.S. (2003) Activation of the programmed cell death pathway by inhibition of proteasome function in plants. *J Biol Chem* 278: 19406-15.
- Klionsky, D.J., & Emr, S.D. (2000) Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290: 1717-21.
- Köhler, R., Zipfel, W., Webb, W., & Hanson, M. (1997) The green fluorescent protein as a marker to visualize plant mitochondria *in vivo*. *Plant J* 11: 613-21.
- Koonin, E., & Aravind, L. (2002) Origin and evolution of eukaryotic apoptosis : the bacterial connection. *Cell Death Differ* 9: 394-404.

- Korsmeyer, S.J., Shutter, J.R., Veis, D.J., Merry, D.E., & Oltvai, Z.N. (1993) Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin Cancer Biol* 4: 327-32.
- Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T.J., Kirschner, M.W., Kohts, K., Kwiatkowski, D.J., & Williams, L.T. (1997) Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278: 294-8.
- Koukalová, B., Kovarík, A., Fajkus, J., & Siroký, J. (1997) Chromatin fragmentation associated with apoptotic changes in tobacco cells exposed to cold stress. *FEBS Lett* 414: 289-92.
- Kozela, C., & Regan, S. (2003) How plants make tubes. *Trends Plant Sci* 8: 159-64.
- Kozopas, K.M., Yang, T., Buchan, H.L., Zhou, P., & Craig, R.W. (1993) MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 3516-20.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., & Sonnhammer, E.L. (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 305: 567-80.
- Kudla, G., Montessuit, S., Eskes, R., Berrier, C., Martinou, J.C., Ghazi, A., & Antonsson, B. (2000) The destabilization of lipid membranes induced by the C-terminal fragment of caspase 8-cleaved bid is inhibited by the N-terminal fragment. *J Biol Chem* 275: 22713-8.
- Kunkel, T., Niu, Q.W., Chan, Y.S., & Chua, N.H. (1999) Inducible isopentenyl transferase as a high-efficiency marker for plant transformation. *Nat Biotechnol* 17: 916-9.
- Kuriyama, H., & Fukuda, H. (2002) Developmental programmed cell death in plants. *Curr Opin Plant Biol* 5: 568-73.
- Lacomme, C., & Santa Cruz, S. (1999) Bax-induced cell death in tobacco is similar to the hypersensitive response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 7956-61.
- Lam, E., & del Pozo, O. (2000) Caspase-like protease involvement in the control of plant cell death. *Plant Mol Biol* 44: 417-28.
- Lam, E., Kato, N., & Lawton, M. (2001) Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 411: 848-53.
- Lam, M., Dubyak, G., Chen, L., Nunez, G., Miesfeld, R.L., & Distelhorst, C.W. (1994) Evidence that BCL-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated Ca²⁺ fluxes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 6569-73.

- Lamkanfi, M., Declercq, W., Kalal, M., Saelens, X., & Vandenabeele, P. (2002) Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell Death Differ* 9: 358-61.
- Lee, R.-H., & Chen, S.-C.G. (2002) Programmed cell death during rice leaf senescence is nonapoptotic. *New Phytol* 155: 25-32.
- Léopold, A.C. (1961) Senescence in plant development. *Science* 134: 1727-32.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., & Yuan, J. (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94: 491-501.
- Li, L.Y., Luo, X., & Wang, X. (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412: 95-9.
- Li, X., & Stark, G.R. (2002) NFkappaB-dependent signaling pathways. *Exp Hematol* 30: 285-96.
- Liang, X.H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., & Levine, B. (1999) Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 402: 672-6.
- Lid, S.E., Gruis, D., Jung, R., Lorentzen, J.A., Ananiev, E., Chamberlain, M., Niu, X., Meeley, R., Nichols, S., & Olsen, A.-A. (2002) The defective kernel 1 (*dek1*) gene required for aleurone cell development in the endosperm of maize grains encodes a membrane protein of the calpain gene superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 5460-5.
- Lin, A. (2003) Activation of the JNK signaling pathway: breaking the brake on apoptosis. *Bioessays* 25: 17-24.
- Lin, Y., Devin, A., Rodriguez, Y., & Liu, Z.G. (1999) Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. *Genes Dev* 13: 2514-26.
- Lindsten, T., Ross, A.J., King, A., Zong, W.X., Rathmell, J.C., Shiels, H.A., Ulrich, E., Waymire, K.G., Mahar, P., Frauwirth, K., Chen, Y., Wei, M., Eng, V.M., Adelman, D.M., Simon, M.C., Ma, A., Golden, J.A., Evan, G., Korsmeyer, S.J., MacGregor, G.R., & Thompson, C.B. (2000) The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell* 6: 1389-99.
- Lockshin, R.A., & Williams, C.M. (1965a) Programmed cell death : I. Cytology of the degeneration of the intersegmental muscles of the *Pernyi* silkworm. *J Insect Physiol* 11: 123-33.
- Lockshin, R.A., & Williams, C.M. (1965b) Programmed cell death : II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J Insect Physiol* 10: 643-9.

- Lockshin, R.A., & Williams, C.M. (1965c) Programmed cell death. V. Cytolytic enzymes in relation to the breakdown of the intersegmental muscles of silkmoths. *J Insect Physiol* 11: 831-44.
- Lockshin, R.A., & Zakeri, Z. (2002) Caspase-independent cell deaths. *Curr Opin Cell Biol* 14: 727-33.
- Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S., Matsudaira, P., & Darnell, J. (1997). *Biologie moléculaire de la cellule*. De Boeck Université, New-York. 1344 pp.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., & Wang, X. (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94: 481-90.
- Lutter, M., Fang, M., Luo, X., Nishijima, M., Xie, X., & Wang, X. (2000) Cardiolipin provides specificity for targeting of tBid to mitochondria. *Nat Cell Biol* 2: 754-61.
- Madeo, F., Herker, E., Maldener, C., Wissing, S., Lachelt, S., Herlan, M., Fehr, M., Lauber, K., Sigrist, S.J., Wesselborg, S., & Frohlich, K.U. (2002) A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol Cell* 9: 911-7.
- Margis, R., & Margis-Pinheiro, M. (2003) Phytocalpains: orthologous calcium-dependent cysteine proteinases. *Trends Plant Sci* 8: 58-62.
- Martin, S.J., O'Brien, G.A., Nishioka, W.K., McGahon, A.J., Mahboubi, A., Saido, T.C., & Green, D.R. (1995) Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis. *J Biol Chem* 270: 6425-8.
- Marty, F. (1999) Plant vacuoles. *Plant Cell* 11: 587-99.
- Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Jurgensmeier, J.M., Susin, S.A., Vieira, H.L., Prévost, M.C., Xie, Z., Matsuyama, S., Reed, J.C., & Kroemer, G. (1998a) Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* 281: 2027-31.
- Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Susin, S.A., Beutner, G., Brdiczka, D., Remy, R., Xie, Z.H., Reed, J.C., & Kroemer, G. (1998b) The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J Exp Med* 187: 1261-71.
- Mathai, J.P., Germain, M., Marcellus, R.C., & Shore, G.C. (2002) Induction and endoplasmic reticulum location of BIK/NBK in response to apoptotic signaling by E1A and p53. *Oncogene* 21: 2534-44.
- Matsuyama, S., Llopis, J., Deveraux, Q.L., Tsien, R.Y., & Reed, J.C. (2000) Changes in intramitochondrial and cytosolic pH: early events that modulate caspase activation during apoptosis. *Nat Cell Biol* 2: 318-25.

- McCabe, P.F., Levine, A., Meijer, P.-J., Tapon, N.A., & Pennel, R.I. (1997) A programmed cell death pathway activated in carrot cells cultured at low cell density. *Plant J* 12: 267-80.
- McCarthy, N.J., Whyte, M.K., Gilbert, C.S., & Evan, G.I. (1997) Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak. *J Cell Biol* 136: 215-27.
- McDonnell, J.M., Fushman, D., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J., & Cowburn, D. (1999) Solution structure of the proapoptotic molecule BID: a structural basis for apoptotic agonists and antagonists. *Cell* 96: 625-34.
- McNellis, T.W., Mudgett, M.B., Li, K., Aoyama, T., Horvath, D., Chua, N.H., & Staskawicz, B.J. (1998) Glucocorticoid-inducible expression of a bacterial avirulence gene in transgenic *Arabidopsis* induces hypersensitive cell death. *Plant J* 14: 247-57.
- Metzstein, M.M., & Horvitz, H.R. (1999) The *C. elegans* cell death specification gene *ces-1* encodes a snail family zinc finger protein. *Mol Cell* 4: 309-19.
- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P., & Moll, U.M. (2003) p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* 11: 577-90.
- Mitsuhara, I., Malik, K.A., Miura, M., & Ohashi, Y. (1999) Animal cell-death suppressors Bcl-x(L) and Ced-9 inhibit cell death in tobacco plants. *Curr Biol* 9: 775-8.
- Mittler, R., & Lam, E. (1996) Sacrifice in the face of foes: pathogen-induced programmed cell death in plants. *Trends Microbiol* 4: 10-5.
- Mittler, R., & Rizhsky, L. (2000) Transgene-induced lesion mimic. *Plant Mol Biol* 44: 335-44.
- Miyashita, T., & Reed, J.C. (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human *bax* gene. *Cell* 80: 293-9.
- Mizushima, N., Sugita, H., Yoshimori, T., & Ohsumi, Y. (1998) A new protein conjugation system in human. The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy. *J Biol Chem* 273: 33889-92.
- Moriyasu, Y., & Ohsumi, Y. (1996) Autophagy in tobacco suspension-cultured cells in response to sucrose starvation. *Plant Physiol* 111: 1233-41.
- Muchmore, S.W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Yoon, H.S., Nettlesheim, D., Chang, B.S., Thompson, C.B., Wong, S.L., Ng, S.L., & Fesik, S.W. (1996) X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 381: 335-41.

- Muzio, M., Stockwell, B.R., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., & Dixit, V.M. (1998) An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* 273: 2926-30.
- Nagata, S. (2000) Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* 256: 12-8.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B.A., & Yuan, J. (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403: 98-103.
- Nakai, K., & Kanehisa, M. (1992) A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. *Genomics* 14: 897-911.
- Nakamura, K., Bossy-Wetzell, E., Burns, K., Fadel, M.P., Lozyk, M., Goping, I.S., Opas, M., Bleackley, R.C., Green, D.R., & Michalak, M. (2000) Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis. *J Cell Biol* 150: 731-40.
- Nakano, K., & Vousden, K.H. (2001) PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 7: 683-94.
- Narita, M., Shimizu, S., Ito, T., Chittenden, T., Lutz, R.J., Matsuda, H., & Tsujimoto, Y. (1998) Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome *c* release in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 14681-6.
- Nechushtan, A., Smith, C.L., Hsu, Y.T., & Youle, R.J. (1999) Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. *EMBO* 18: 2330-41.
- Neill, S., Desikan, R., & Hancock, J. (2002a) Hydrogen peroxide signaling. *Current Opin Plant Biol* 5: 388-95.
- Neill, S.J., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R.D., & Hancock, J.T. (2002b) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J Exp Bot* 53: 1237-47.
- Newbigin, E., & Vierstra, R.D. (2003) Plant reproduction: Sex and self-denial. *Nature* 423: 229-30.
- Ng, F.W., Nguyen, M., Kwan, T., Branton, P.E., Nicholson, D.W., Cromlish, J.A., & Shore, G.C. (1997) p28 Bap31, a Bcl-2/Bcl-XL- and procaspase-8-associated protein in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 139: 327-38.
- Nigro, J.M., Baker, S.J., Preisinger, A.C., Jessup, J.M., Hostetter, R., Cleary, K., Bigner, S.H., Davidson, N., Baylin, S., Devilee, P., & et al. (1989) Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 342: 705-8.
- Nutt, L.K., Chandra, J., Pataer, A., Fang, B., Roth, J.A., Swisher, S.G., O'Neil, R.G., & McConkey, D.J. (2002a) Bax-mediated Ca²⁺ mobilization promotes cytochrome *c* release during apoptosis. *J Biol Chem* 277: 20301-8.

- Nutt, L.K., Pataer, A., Pahler, J., Fang, B., Roth, J., McConkey, D.J., & Swisher, S.G. (2002b) Bax and Bak promote apoptosis by modulating endoplasmic reticular and mitochondrial Ca^{2+} stores. *J Biol Chem* 277: 9219-25.
- O'Brien, I.E.W., Baguley, B.C., Murray, B.G., Morris, B.A.M., & Ferguson, I.B. (1998) Early stages of the apoptotic pathway in plant cells are reversible. *Plant J* 13: 803-14.
- 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* 288: 1053-8.
- Oltvai, Z.N., Millman, C.L., & Korsmeyer, S.J. (1993) Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74: 609-19.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., & Nicotera, P. (2003) Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 552-65.
- Parone, P.A., James, D., & Martinou, J.C. (2002) Mitochondria: regulating the inevitable. *Biochimie* 84: 105-11.
- Parrish, J., Li, L., Klotz, K., Ledwich, D., Wang, X., & Xue, D. (2001) Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*. *Nature* 412: 90-4.
- Pennel, R.I., & Lamb, C. (1997) Programmed cell death in plants. *Plant Cell* 9: 1157-68.
- Petros, A.M., Medek, A., Nettesheim, D.G., Kim, D.H., Yoon, H.S., Swift, K., Matayoshi, E.D., Oltersdorf, T., & Fesik, S.W. (2001) Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 3012-7.
- Pinton, P., Ferrari, D., Magalhães, P., Schulze-Osthoff, K., Di Virgilio, F., Pozzan, T., & Rizzuto, R. (2000) Reduced loading of intracellular Ca^{2+} stores and downregulation of capacitative Ca^{2+} influx in Bcl-2-overexpressing cells. *J Cell Biol* 148: 857-62.
- Pinton, P., Ferrari, D., Rapizzi, E., Di Virgilio, F.D., Pozzan, T., & Rizzuto, R. (2001) The Ca^{2+} concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action. *EMBO J* 20: 2690-701.
- Priault, M., Chaudhuri, B., Clow, A., Camougrand, N., & Manon, S. (1999) Investigation of bax-induced release of cytochrome *c* from yeast mitochondria permeability of mitochondrial membranes, role of VDAC and ATP requirement. *Eur J Biochem* 260: 684-91.
- Puthalakath, H., Huang, D.C., O'Reilly, L.A., King, S.M., & Strasser, A. (1999) The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell* 3: 287-96.

- Puthalakath, H., Villunger, A., O'Reilly, L.A., Beaumont, J.G., Coultas, L., Cheney, R.E., Huang, D.C., & Strasser, A. (2001) Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science* 293: 1829-32.
- Qiao, J., Mitsuhashi, I., Yazaki, Y., Sakano, K., Gotoh, Y., Miura, M., & Ohashi, Y. (2002) Enhanced resistance to salt, cold and wound stresses by overproduction of animal cell death suppressors Bcl-xL and Ced-9 in tobacco cells - Their possible contribution through improved function of organelle. *Plant Cell Physiol* 43: 992-1005.
- Quirino, B.F., Noh, Y.-S., Hmelblau, E., & Amasino, T.M. (2000) Molecular aspects of leaf senescence. *Trends Plant Sci* 5: 278-82.
- Rao, L., Perez, D., & White, E. (1996) Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol* 135: 1441-55.
- Rao, M.V., Koch, J.R., & Davis, K.R. (2000) Ozone: a tool for probing programmed cell death in plants. *Plant Mol Biol* 44: 345-58.
- Raven, P.H., Evert, R.F., & Eichhorn, S.E. (1999). *Biology of Plants*. Sixth Edition. W.H. Freeman and Company, New-York. 944 pp.
- Reed, J.C. (1998) Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 17: 3225-36.
- Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F.S., Fogarty, K.E., Lifshitz, L.M., Tuft, R.A., & Pozzan, T. (1998) Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science* 280: 1763-6.
- Rodriguez, J., & Lazebnik, Y. (1999) Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev* 13: 3179-84.
- Rotonda, J., Nicholson, D.W., Fazil, K.M., Gallant, M., Gareau, Y., Labelle, M., Peterson, E.P., Rasper, D.M., Ruel, R., Vaillancourt, J.P., Thornberry, N.A., & Becker, J.W. (1996) The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat Struct Biol* 3: 619-25.
- Rubino, L., Weber-Lotfi, F., Dietrich, A., Stussi-Garud, C., & Russo, M. (2001) The open reading frame 1-encoded ('36K') protein of carnation italian ringspot virus localizes to mitochondria. *J Gen Virol* 82: 29-34.
- Rubinstein, B. (2000) Regulation of cell death in flower petals. *Plant Mol Biol* 44: 303-18.
- Rudel, T., & Bokoch, G.M. (1997) Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science* 276: 1571-4.
- Rudner, J., Jendrossek, V., & Belka, C. (2002) New insights in the role of Bcl-2 Bcl-2 and the endoplasmic reticulum. *Apoptosis* 7: 441-7.

- 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. *J Cell Sci* 114: 4161-72.
- Saito, M., Korsmeyer, S.J., & Schlesinger, P.H. (2000) BAX-dependent transport of cytochrome *c* reconstituted in pure liposomes. *Nat Cell Biol* 2: 553-5.
- Salvesen, G.S., & Dixit, V.M. (1999) Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 10964-7.
- Salvesen, G.S., & Duckett, C.S. (2002) IAP proteins : blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 401-10.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanchez, P., de Torres Zabala, M., & Grant, M. (2000) AtBI-1, a plant homologue of Bax inhibitor-1, suppresses Bax-induced cell death in yeast and is rapidly upregulated during wounding and pathogen challenge. *Plant J* 21: 393-9.
- Sattler, M., Liang, H., Nettlesheim, D., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Eberstadt, M., Yoon, H.S., Shuker, S.B., Chang, B.S., Minn, A.J., Thompson, C.B., & Fesik, S.W. (1997) Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* 275: 983-6.
- Schlesinger, P.H., Gross, A., Yin, X.M., Yamamoto, K., Saito, M., Waksman, G., & Korsmeyer, S.J. (1997) Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 11357-62.
- Schwartz, L.M., Smith, S.W., Jones, M.E.E., & Osborne, B.A. (1993) Do all programmed cell deaths occur via apoptosis? *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 980-4.
- Scorrano, L., Oakes, S.A., Opferman, J.T., Cheng, E.H., Sorcinelli, M.D., Pozzan, T., & Korsmeyer, S.J. (2003) BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca^{2+} : a control point for apoptosis. *Science* 300: 135-9.
- Shi, Y. (2002) Apoptosome: the cellular engine for the activation of caspase-9. *Structure* 10: 285-8.
- Shimizu, S., Eguchi, Y., Kamiike, W., Funahashi, Y., Mignon, A., Lacronique, V., Matsuda, H., & Tsujimoto, Y. (1998) Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 1455-9.
- Shimizu, S., Narita, M., & Tsujimoto, Y. (1999) Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome *c* by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399: 483-7.

- Shirane, M., & Nakayama, K.I. (2003) Inherent calcineurin inhibitor FKBP38 targets Bcl-2 to mitochondria and inhibits apoptosis. *Nat Cell Biol* 5: 28-37.
- Shirasu, K., & Schulze-Lefert, P. (2000) Regulators of cell death in disease resistance. *Plant Mol Biol* 44: 371-85.
- Skulachev, V. (2002) Programmed death in yeast as adaptation ? *FEBS Lett* 528: 23-6.
- Stennicke, H.R., Deveraux, Q.L., Humke, E.W., Reed, J.C., Dixit, V.M., & Salvesen, G.S. (1999) Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J Biol Chem* 274: 8359-62.
- Stone, S.L., Anderson, E.M., Mullen, R.T., & Goring, D.R. (2003) ARC1 is an E3 ubiquitin ligase and promotes the ubiquitination of proteins during the rejection of self-incompatible Brassica pollen. *Plant Cell* 15: 885-98.
- Strasser, A., Whittingham, S., Vaux, D.L., Bath, M.L., Adams, J.M., Cory, S., & Harris, A.W. (1991) Enforced BCL2 expression in B-lymphoid cells prolongs antibody responses and elicits autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 8661-5.
- Stroh, C., & Schulze-Osthoff, K. (1998) Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates. *Cell Death Differ* 5: 997-1000.
- Stromhaug, P.E., & Klionsky, D.J. (2001) Approaching the molecular mechanism of autophagy. *Traffic* 2: 524-31.
- Sugiyama, M., Ito, J., Aoyagi, S., & Fukuda, H. (2000) Endonucleases. *Plant Mol Biol* 44: 387-97.
- Suzuki, M., Youle, R.J., & Tjandra, N. (2000) Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* 103: 645-54.
- Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K., & Takahashi, R. (2001) A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* 8: 613-21.
- Szallies, A., Kubata, B.K., & Duszenko, M. (2002) A metacaspase of *Trypanosoma brucei* causes loss of respiration competence and clonal death in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 517: 144-50.
- Tamatani, M., Che, Y.H., Matsuzaki, H., Ogawa, S., Okado, H., Miyake, S., Mizuno, T., & Tohyama, M. (1999) Tumor necrosis factor induces Bcl-2 and Bcl-x expression through NFkappaB activation in primary hippocampal neurons. *J Biol Chem* 274: 8531-8.
- Tanida, I., Tanida-Miyake, E., Komatsu, M., Ueno, T., & Kominami, E. (2002) Human Apg3p/Aut1p homologue is an authentic E2 enzyme for multiple substrates, GATE-

- 16, BABARAP, and MAP-LC3, and facilitates the conjugation of hApg12p to hApg5p. *J Biol Chem* 277: 13739-44.
- Thomenius, M.J., Wang, N.S., Reineks, E.Z., Wang, Z., & Distelhorst, C.W. (2003) Bcl-2 on the endoplasmic reticulum regulates Bax activity by binding to BH3-only proteins. *J Biol Chem* 278: 6243-50.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D.G. (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876-82.
- Thornberry, N.A., & Lazebnik, Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science* 281: 1312-6.
- Thornberry, N.A., Rano, T.A., Peterson, E.P., Rasper, D.M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V.M., Nordstrom, P.A., Roy, S., Vaillancourt, J.P., Chapman, K.T., & Nicholson, D.W. (1997) A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* 272: 17907-11.
- Tiwari, B.S., Belenghi, B., & Levine, A. (2002) Oxidative stress increased respiration and generation of reactive oxygen species, resulting in ATP depletion, opening of mitochondrial permeability transition, and programmed cell death. *Plant Physiol* 128: 1271-81.
- Toyooka, K., Okamoto, T., & Minamikawa, T. (2001) Cotyledon cells of *Vigna mungo* seedlings use at least two distinct autophagic machineries for degradation of starch granules and cellular components. *J Cell Biol* 154: 973-82.
- Uren, A.G., O'Rourke, K., Aravind, L.A., Pisabarro, M.T., Seshagiri, S., Koonin, E.V., & Dixit, V.M. (2000) Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol Cell* 6: 961-7.
- van Loo, G., Schotte, P., van Gurp, M., Demol, H., Hoorelbeke, B., Gevaert, K., Rodriguez, I., Ruiz-Carrillo, A., Vandekerckhove, J., Declercq, W., Beyaert, R., & Vandenabeele, P. (2001) Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Differ* 8: 1136-42.
- Vander Heiden, M.G., Chandel, N.S., Schumacker, P.T., & Thompson, C.B. (1999) Bcl-xL prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial ATP/ADP exchange. *Mol Cell* 3: 159-67.
- Vaux, D.L. (2002) Apoptosis Timeline. *Cell Death and Differentiation* 9: 349-54.
- Vaux, D.L., Cory, S., & Adams, J.M. (1988) Bcl-2 gene promotes hematopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335: 440-2.

- Vaux, D.L., Weissman, I.L., & Kim, S.K. (1992) Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science* 258: 1955-7.
- Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J., & Vaux, D.L. (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102: 43-53.
- Verma, S., Zhao, L.J., & Chinnadurai, G. (2001) Phosphorylation of the pro-apoptotic protein BIK: mapping of phosphorylation sites and effect on apoptosis. *J Biol Chem* 276: 4671-6.
- Vierstra, R.D. (2003) The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends Plant Sci* 8: 135-42.
- von Ahsen, O., Renken, C., Perkins, G., Kluck, R.M., Bossy-Wetzler, E., & Newmeyer, D.D. (2000) Preservation of mitochondrial structure and function after Bid- or Bax-mediated cytochrome *c* release. *J Cell Biol* 150: 1027-36.
- von Heijne, G. (1992) Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J Mol Biol* 225: 487-94.
- Vranová, E., Inzé, D., & Van Breusegem, F. (2002) Signal transduction during oxidative stress. *J Exp Bot* 533: 1227-36.
- Wajant, H. (2002) The Fas signaling pathway : more than a paradigm. *Science* 296: 1635-6.
- Wang, B., Nguyen, M., Breckenridge, D.G., Stojanovic, M., Clemons, P.A., Kuppig, S., & Shore, G.C. (2003) Uncleaved BAP31 in association with A4 protein at the endoplasmic reticulum is an inhibitor of Fas-initiated release of cytochrome *c* from mitochondria. *J Biol Chem* 278: 14461-8.
- Wang, H., Li, J., Bostock, R.M., & Gilchrist, D.G. (1996) Apoptosis : a functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development. *Plant Cell* 8: 375-91.
- Wang, H.G., Pathan, N., Ethell, I.M., Krajewski, S., Yamaguchi, Y., Shibasaki, F., McKeon, F., Bobo, T., Franke, T.F., & Reed, J.C. (1999) Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* 284: 339-43.
- Wang, N.S., Unkila, M.T., Reineks, E.Z., & Distelhorst, C.W. (2001) Transient expression of wild-type or mitochondrially targeted Bcl-2 induces apoptosis, whereas transient expression of endoplasmic reticulum-targeted Bcl-2 is protective against Bax-induced cell death. *J Biol Chem* 276: 44117-28.
- Waterhouse, N.J., Goldstein, J.C., von Ahsen, O., Schuler, M., Newmeyer, D.D., & Green, D.R. (2001) Cytochrome *c* maintains mitochondrial transmembrane potential and

- ATP generation after outer mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process. *J Cell Biol* 153: 319-28.
- Watt, W., Koeplinger, K.A., Mildner, A.M., Henrikson, R.L., Tomaselli, A.G., & Watenpaugh, K.D. (1999) The atomic-resolution structure of human caspase-8, a key activator of apoptosis. *Structure* 7: 1135-43.
- Wei, Y., Fox, T., Chambers, S.P., Sintchak, J., Coll, J.T., Golec, M.C., Swenson, L., Wilson, K.P., & Charifson, P.S. (2000) The structures of caspases-1, -3, -7 and -8 reveal the basis for substrate and inhibitor selectivity. *Chem Biol* 7: 423-32.
- Williams, J.R., Little, J.B., & Shipley, W.U. (1974) Association of mammalian cell death with a specific endonucleolytic degradation of DNA. *Nature* 252: 754-5.
- Wilson, K.P., Black, J.A., Thomson, J.A., Kim, E.E., Griffith, J.P., Navia, M.A., Murcko, M.A., Chambers, S.P., Aldape, R.A., Raybuck, S.A., & Livingston, D.J. (1994) Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature* 370: 270-5.
- Wolf, B.B., & Green, D.R. (2002) Apoptosis : letting slip the dogs of war. *Curr Biol* 12: R177-R9.
- Woltering, E.J., van der Bent, A., & Hoerberichts, F.A. (2002) Do plant caspases exist? *Plant Physiol* 130: 1764-9.
- Wu, H., & Cheung, A.Y. (2000) Programmed cell death in plant reproduction. *Plant Mol Biol* 44: 267-81.
- Wyllie, A.H. (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284: 555-6.
- Xiang, J., Chao, D.T., & Korsmeyer, S.J. (1996) BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 14559-63.
- Xu, Q., & Reed, J.C. (1998) Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast. *Mol Cell* 1: 337-46.
- Yang, X., Chang, H.Y., & Baltimore, D. (1998a) Autoproteolytic activation of pro-caspases by oligomerization. *Mol Cell* 1: 319-25.
- Yang, X., Chang, H.Y., & Baltimore, D. (1998b) Essential role of CED-4 oligomerization in CED-3 activation and apoptosis. *Science* 281: 1355-7.
- Yang, Y.L., & Xiao, M.L. (2000) The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities. *Cell Research* 10: 169-77.

- Yarmolinsky, M.B. (1995) Programmed cell death in bacterial populations. *Science* 267: 836-7.
- Yin, X.M., Oltvai, Z.N., & Korsmeyer, S.J. (1994) BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 369: 321-3.
- Yoshida, S. (2003) Molecular regulation of leaf senescence. *Curr Opin Plant Biol* 6: 79-84.
- Young, T.E., & Gallie, D.R. (2000) Programmed cell death during endosperm development. *Plant Mol Biol* 44: 283-301.
- Yu, L.-H., Kawai-Yamada, M., Naito, M., Watanabe, K., Reed, J.C., & Uchimiya, H. (2002) Induction of mammalian cell death by a plant Bax inhibitor. *FEBS Lett* 512: 308-12.
- Yuan, J., & Horvitz, H.R. (1992) The *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-4* encodes a novel protein and is expressed during the period of extensive programmed cell death. *Development* 116: 309-20.
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M., & Horvitz, H.R. (1993) The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75: 641-52.
- Zakeri, Z., & Lockshin, R.A. (2002) Cell death during development. *J Immunol Methods* 265: 3-20.
- Zha, H., Aimé-Sempé, C., Sato, T., & Reed, J.C. (1996a) Proapoptotic protein Bax heterodimerizes with Bcl-2 and homodimerizes with Bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2. *J Biol Chem* 271: 7440-4.
- Zha, H., Fisk, H.A., Yaffe, M.P., Mahajan, N., Herman, B., & Reed, J.C. (1996b) Structure-function comparisons of the proapoptotic protein Bax in yeast and mammalian cells. *Mol Cell Biol* 16: 6494-508.
- Zha, J., Harada, H., Osipov, K., Jockel, J., Waksman, G., & Korsmeyer, S.J. (1997) BH3 domain of BAD is required for heterodimerization with BCL-XL and pro-apoptotic activity. *J Biol Chem* 272: 24101-4.
- Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., & Korsmeyer, S.J. (1996c) Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 87: 619-28.
- Zhang, S., & Klessig, D.F. (2001) MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends Plant Sci* 6: 520-7.

- Zhu, W., Cowie, A., Wasfy, G.W., Penn, L.Z., Leber, B., & Andrews, D.W. (1996) Bcl-2 mutants with restricted subcellular location reveal spatially distinct pathways for apoptosis in different cell types. *EMBO J* 15: 4130-41.
- Ziskind, J.W., & Bernstein, S.I. (1992). Recombinant DNA Laboratory Manual, Revised Edition. Academic Press, Elsevier Science. 195 pp.
- Zong, W.X., Edelstein, L.C., 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 Dev* 13: 382-7.