

NATHALIE BOLDUC

**CARACTÉRISATION DE BAX INHIBITOR-1 ET DE  
SON RÔLE DANS LA MORT CELLULAIRE  
PROGRAMMÉE CHEZ LES VÉGÉTAUX**

Thèse présentée  
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval  
dans le cadre du programme de doctorat en biochimie  
pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

FACULTÉ DES SCIENCES ET DE GÉNIE  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

MARS 2005

## Résumé

La mort cellulaire programmée (PCD) est un processus physiologique ou pathologique permettant l'élimination sélective de cellules devenues inutiles, endommagées ou infectées pour le maintien de l'intégrité ou l'adaptation (*fitness*) de l'organisme ou de la population cellulaire. Chez les végétaux, les mécanismes moléculaires régulant la PCD ne sont pas encore élucidés, mais la découverte que la protéine humaine anti-PCD Bax Inhibitor-1 (BI-1) est conservée chez les plantes, pourtant dépourvues de la protéine pro-PCD Bax, en a fait un candidat fort prometteur pour l'élucidation de sentiers de mort évolutivement conservés. En ce sens, cette thèse décrit la caractérisation d'orthologues de BI-1 isolés de *Brassica napus* (*BnBI-1*) et de *Nicotiana tabacum* (*NtBI-1*). Nous avons déterminé par des analyses informatiques et des études d'expression que BI-1 est une protéine membranaire intégrale possédant sept domaines transmembranaires putatifs et localisée au réticulum endoplasmique. Des essais fonctionnels dans des cellules humaines HEK 293 ont révélé que des orthologues végétaux de BI-1 peuvent inhiber la PCD (apoptose) induite par Bax dans ces cellules. Par ailleurs, des lignées cellulaires de tabac présentant des niveaux inférieurs de la protéine NtBI-1 grâce à l'expression d'un ARNm antisens entament un programme précoce de PCD suite à une déficience en carbone, démontrant ainsi le rôle anti-PCD intrinsèque de BI-1 dans des cellules végétales. Nous avons également découvert que la protéine NtBI-1 est surexprimée en présence de cytokinines (CK) dans des cultures cellulaires de tabac, et ce à des concentrations coïncidant avec l'établissement d'une réponse de stress, un phénomène impliquant des mécanismes de régulation post-transcriptionnels. La réponse cellulaire envers les CK comprend également un influx rapide de  $\text{Ca}^{2+}$  de l'apoplaste vers le cytosol. Cet influx est partiellement impliqué dans l'induction de la PCD mais non dans la signalisation menant à la surexpression de BI-1. L'ensemble de nos résultats indique que BI-1 est bel et bien un régulateur négatif de la PCD végétale, qui agirait au sein d'un sentier de mort évolutivement conservé. L'augmentation de l'accumulation de la protéine NtBI-1 lors de la réponse de stress envers les CK pourrait contribuer à la survie des cellules et laisse supposer que la protéine est impliquée dans l'activité anti-sénescence des CK. BI-1 s'insère dans un sentier où son niveau d'expression influence la capacité cellulaire à résister aux stress générés entre autres par une disette en carbone, et ce potentiellement *via* la modulation de l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire.

## Abstract

Programmed cell death (PCD) is a physiological or pathological process allowing the selective elimination of useless, damaged or infected cells with the aim of maintaining the integrity or fitness of the remaining organism or cell population. In plants, molecular mechanisms regulating PCD are not yet elucidated, but the identification of functional plant orthologs of the human anti-PCD protein Bax Inhibitor-1 (BI-1), given that the pro-PCD protein Bax is absent in the plant kingdom, revealed the potential of BI-1 as an evolutionary conserved cell death regulator. Accordingly, this thesis describes the characterization of BI-1 orthologs isolated from *Brassica napus* (*BnBI-1*) and *Nicotiana tabacum* (*NtBI-1*). While combining bioinformatics analysis and localization studies using a fusion between BnBI-1 and the *green fluorescent protein*, we determined that BI-1 is an integral membrane protein provided with seven putative transmembrane domains localized at the endoplasmic reticulum. We also proceeded to functional assays in human HEK 293 cells, and we demonstrated that plant BI-1 orthologs can inhibit Bax-induced PCD (apoptosis) in these mammalian cells. On the other hand, we demonstrated that tobacco cell lines expressing lower levels of the NtBI-1 protein *via* an antisense mRNA induced an early PCD program under carbon starvation. We also discovered the up-regulation of NtBI-1 when cultured cells were grown in the presence of cytokinins (CKs), which correlated with the establishment of a stress response. The phenomenon involved post-transcriptional regulatory mechanisms of the BI-1 protein accumulation. Cellular response to CKs also involved a rapid influx of  $\text{Ca}^{2+}$  from the apoplast to the cytosol and this influx is partly involved in PCD induction but not in signaling leading to BI-1 modulation. Taken together, our data indicate that BI-1 is a negative regulator of plant PCD that would act in an evolutionary conserved death pathway. NtBI-1 protein over-accumulation in the stress response to CKs could contribute to cell survival and suggests the involvement of the protein in the senescence-delay activities of CKs. BI-1 is part of a pathway where its expression level influence cellular ability to resist to carbon starvation- or senescence-induced stresses, potentially *via* modulation of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis.

## Avant-propos

Toute bonne chose ayant une fin, c'est maintenant pour moi le temps de jeter la serviette et de terminer cette trépidante aventure que fut le doctorat. Mon parcours fut parsemé d'émotions de toutes sortes : enthousiasme, excitation, fatigue, stress, lassitude, toute la gamme y a passé dans l'ordre et dans le désordre. À un certain moment donné en début de parcours, j'ai même pensé tout abandonner, incertaine de la façon dont je voulais orienter ma vie. Plusieurs années d'incertitudes plus tard, j'en suis finalement là, en train de rédiger l'avant-propos de ma thèse, que je me suis réservé pour la toute fin de cette dernière partie de l'aventure mais non la moindre, la rédaction, que je ne suis pas fâchée de terminer. Je crois laisser pour la postérité un compte rendu de qualité : j'y ai mis tout mon cœur ainsi que tout mon savoir-faire accumulé depuis 29 ans.

J'en profite au passage pour remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réussite de mon aventure, que je comparerais à la communauté de l'anneau du monde fantastique de J.R.R. Tolkien. Tel le grand sage Gandalf, ma directrice de recherche Dre Louise Brisson m'a admirablement guidée dans mon parcours, et ce en sachant me laisser toute la latitude nécessaire à l'élaboration d'une pensée scientifique critique et autonome. Toujours ouverte à mes idées, mes critiques, mes réserves, mes espoirs, Louise est remarquable pour son humanité. Merci infiniment Louise!

Je m'en voudrais de ne pas mentionner ces autres mentors expérimentés qui m'ont aussi prodigué de sages conseils tout au long du parcours. Ainsi, le Dr André Darveau a mis à ma disposition ses installations pour la culture cellulaire et a maintes fois tenu la torche qui éclairait le chemin vers la transfection de cellules animales et la production d'anticorps. De même, le Dr Dominick Pallotta a siégé en compagnie du Dr Darveau sur mon comité aviseur, mais a également gentiment accepté de procéder à la prélecture de ma thèse en plus de m'avoir fourni levures et bons conseils pour certaines expériences. De son côté, le Dr Stephen Cessna a toujours répondu patiemment à mes interminables questions portant sur le calcium et la complexité de sa quantification. Finalement, j'aimerais aussi souligner la

contribution du Dr Marc Rideau qui a accepté, malgré une demande formulée plutôt à la dernière minute, le rôle d'évaluateur externe de ma thèse. D'autres compagnons m'ont également épaulée de différentes façons dans ma quête du Ph.D. et sans tous les nommer ici (je risquerais fâcheusement d'en oublier), je tiens à les remercier : collègues de travail complices, stagiaires maladroits mais bien intentionnés, amis de longue date espiègles ou fêtards, tous ceux à qui le chapeau semble adéquat, je vous le mets chaleureusement. Je tiens aussi à adresser des remerciements particuliers à Dre Marguerite Loembé, Dre Hélène Chamberland et André Laroche pour avoir généreusement partagé avec moi leur précieux savoir technique. Un gros merci à tous!

Dans le *Seigneur des anneaux*, le héros Frodo ne se rend pas seul jusque dans les profondeurs du Mordor, mais y parvient plutôt aux côtés de son indissociable compagnon Sam, qui lui prodigue bons soins, support et amitié. Bien sûr, Frodo a côtoyé d'autres compagnons, mais Sam est probablement celui qui sait le mieux le comprendre et dont il a été le plus proche. Mon compagnon Mario, l'homme de ma vie, m'a rejointe quelques temps après mon départ vers le Ph.D., puis accompagnée peu importe les obstacles dans cette grande aventure. Il m'a dorlotée, réconfortée, encouragée, stimulée, amusée, divertie, aimée. Merci Mario. Et je compte encore sur toi pour la suite!

Dans l'univers fantastique de Tolkien, les questions monétaires ne semblent pas préoccupantes, mais dans « le vrai monde » elles sont, malheureusement, omniprésentes. Je tiens donc à remercier les organismes subventionnaires qui m'ont supportée directement pendant les trois premières années de mon cheminement : le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) et le Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT).

Étonnamment, je n'ai pas rencontré le méchant Saroumane dans mon parcours. Mon père dirait peut-être que c'est ma bonne étoile ou encore ma mère dirait que je mène une bonne vie. Peut-être l'ai-je rencontré sans même le reconnaître? Je crois que l'on bâtit soi-même sa chance et que l'on crée sa propre bonne étoile... En réalité, Saroumane se cachait à tous les détours que j'ai pris pour parvenir jusqu'ici, mais grâce à un travail acharné, il n'a pas

été capable de m'arrêter, même s'il m'a parfois ralentie. Mais on apprend de ses erreurs et Saroumane est-il vraiment méchant? Comme Gandalf le disait si bien, nul ne sait si à la fin un homme mauvais ne fera pas le bien. Il en va de même des obstacles que nous réserve la vie.

Je clos donc cette aventure sans regret et avec fierté.

« Je doute parfois si j'aime la biologie parce qu'elle est science de la vie, ou si j'aime la vie parce qu'elle sert d'objet à la biologie » [Jean Rostand (1894-1977), *Carnet d'un biologiste*, Stock, Paris, 1959].

*Life is a great surprise.  
I do not see  
why death should not be  
an even greater one.*

Vladimir Nabokov  
(1899-1977)  
romancier

*La chance,  
pour un chercheur,  
est de trouver des faits qui  
ressemblent à ce qui  
le passionne.*

Jean Rostand  
(1894-1977)  
biologiste

## Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Avant-propos .....	iii
Table des matières .....	vii
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures.....	xii
Liste des abréviations.....	xiv
Liste des abréviations.....	xiv
1 Introduction.....	2
1.1 Mort cellulaire programmée : un aperçu historique.....	2
1.2 PCD animale : diversité morphologique et autres considérations .....	5
1.2.1 PCD vs nécrose.....	5
1.2.2 PCD : apoptotique ou autophagique ? .....	7
1.3 Apoptose - mode d'emploi .....	9
1.3.1 Préliminaires.....	9
1.3.2 Caspases.....	10
1.3.3 Les récepteurs de mort.....	13
1.3.4 Les mitochondries à l'origine des condamnations.....	13
1.3.4.1 Bax – <i>natural born killer</i> .....	17
1.3.5 Le rôle du Ca <sup>2+</sup> et du réticulum endoplasmique .....	19
1.3.5.1 Généralités .....	19
1.3.5.2 Le lien RE-mitochondries.....	19
1.3.5.3 La famille Bcl-2 en action au RE.....	23
1.3.5.4 Bax Inhibitor-1 : pas de la famille mais très impliqué.....	25
1.4 La PCD chez les végétaux .....	27
1.4.1 Survol : PCD développementale et adaptative .....	28
1.4.1.1 Détermination du sexe .....	31
1.4.1.2 Formation du pollen.....	32
1.4.1.3 Formation de l'ovule et fertilisation .....	33
1.4.1.4 Formation de la graine et germination.....	35
1.4.1.4.1 Généralités .....	35
1.4.1.4.2 Endosperme amylicé et embryogenèse .....	36
1.4.1.4.3 Aleurone.....	37
1.4.1.5 La racine : développement et adaptation à la croisée des chemins.....	39
1.4.1.6 Formation des tissus vasculaires.....	41
1.4.1.7 Sénescence.....	43
1.4.1.8 Réponse hypersensible (HR) et résistance aux pathogènes .....	47
1.4.1.9 Stress biotiques, abiotiques et modèles <i>in vitro</i> .....	49
1.4.2 Transduction de signal .....	51
1.4.2.1 Les ROS et le NO dans la PCD végétale .....	52
1.4.2.2 Phytohormones .....	55
1.4.2.2.1 Acide salicylique.....	58
1.4.2.2.2 Cytokinines .....	60

1.4.2.2.3 Acide jasmonique, éthylène, ABA et GA.....	62
1.4.2.2.4 Les récepteurs des phytohormones.....	64
1.4.2.3 Implication du Ca <sup>2+</sup> dans la PCD végétale.....	67
1.4.2.3.1 Généralités.....	67
1.4.2.3.2 Ca <sup>2+</sup> , ROS et PCD végétale.....	71
1.4.2.4 Mitochondries et RE.....	74
1.4.3 Exécution.....	79
1.4.3.1 Protéases.....	79
1.4.3.2 Métacaspases.....	81
1.4.3.3 Nucléases.....	83
1.4.4 Régulateurs ? Le trou noir de la PCD végétale.....	84
1.4.4.1 Considérations générales.....	84
1.4.4.2 La famille Bcl-2 en visite chez les végétaux.....	85
1.4.4.3 <i>Defender against apoptotic cell death (DADI)</i> est conservé entre les animaux et les végétaux.....	86
1.4.4.4 BI-1 à la conquête du Graal.....	87
1.5 Objectifs de la recherche.....	88
1.5.1 Aperçu de la thèse.....	88
2 Caractérisation moléculaire de deux homologues végétaux de BI-1 ayant la capacité de supprimer l'apoptose induite par Bax dans des cellules 293 humaines.....	91
2.1 Résumé.....	92
2.2 Article.....	93
2.2.1 Abstract.....	94
2.2.2 Footnotes.....	95
2.2.3 Introduction.....	95
2.2.4 Materials and methods.....	97
2.2.4.1 Cloning of <i>AtBI-1</i> homologues and sequence analysis.....	97
2.2.4.2 Plasmid construction.....	97
2.2.4.3 Cell death assays.....	98
2.2.4.4 Northern blot analysis.....	99
2.2.4.5 Plant material and transformation.....	99
2.2.4.6 Yeast methods.....	100
2.2.4.7 Immunoblot analysis.....	100
2.2.4.8 Immunofluorescence labelling.....	101
2.2.4.9 Microscopic examinations.....	101
2.2.5 Results.....	102
2.2.5.1 Cloning and sequence analysis of rapeseed and tobacco <i>BI-1</i> .....	102
2.2.5.2 Plant homologues of BI-1 suppress Bax-induced apoptosis in human 293 cells.....	105
2.2.5.3 BnBI-1 is located in the endoplasmic reticulum (ER) of tobacco and yeast cells.....	107
2.2.5.4 The C-terminus of BnBI-1 is located on the cytosolic side of the ER.....	110
2.2.6 Discussion.....	112
2.2.7 Acknowledgements.....	115
2.2.8 References.....	115
3 La répression de NtBI-1 dans des cellules BY-2 de tabac <i>via</i> un messenger antisens induit une accélération de la mort cellulaire en l'absence d'une source de carbone.....	122

3.1	Résumé.....	123
3.2	Article .....	124
3.2.1	Abstract.....	124
3.2.2	Footnotes.....	124
3.2.3	Introduction.....	125
3.2.4	Materials and methods .....	126
3.2.4.1	Generation of AS cell lines.....	126
3.2.4.2	Immunoblot analysis.....	126
3.2.4.3	Sucrose starvation and cell death assays.....	127
3.2.4.4	DNA fragmentation analysis .....	127
3.2.5	Results and discussion .....	128
3.2.5.1	Generation of AS cell lines and NtBI-1 analysis.....	128
3.2.5.2	Observation of AS cell lines under standard growing conditions .....	129
3.2.5.3	Observation of AS cell lines under carbon starvation .....	130
3.2.5.3.1	Evaluation of mortality .....	130
3.2.5.3.2	DNA fragmentation analysis .....	133
3.2.6	Concluding remarks.....	135
3.2.7	Acknowledgements.....	135
3.2.8	References.....	136
4	L'accumulation du régulateur négatif de la mort cellulaire programmée Bax Inhibitor-1 est favorisée par les cytokinines dans des cellules de <i>Nicotiana tabacum</i> .....	139
4.1	Résumé.....	140
4.2	Article .....	141
4.2.1	Abstract.....	142
4.2.2	Footnotes.....	143
4.2.3	Introduction.....	143
4.2.4	Materials and Methods.....	146
4.2.4.1	Plant material, culture conditions and hormonal treatments.....	146
4.2.4.2	Adenosine kinase inhibitor assay, short treatment assay and others .....	146
4.2.4.3	Immunoblot and northern blot analysis .....	147
4.2.4.4	Fresh weight increase and cell viability determination .....	147
4.2.4.5	Luminometry and Ca <sup>2+</sup> quantification .....	147
4.2.4.6	Data analysis.....	148
4.2.5	Results.....	148
4.2.5.1	Hormonal modulation of NtBI-1 in cell cultures.....	148
4.2.5.2	CKs induce NtBI-1 upregulation at growth limiting concentrations.....	149
4.2.5.3	Bap-induced modulation of NtBI-1 protein accumulation involves post-transcriptional regulation .....	154
4.2.5.4	Bap-induced stress response can be monitored with the stress marker PR1a .....	156
4.2.5.5	Inhibition of intracellular Bap phosphorylation modifies Bap-induced NtBI-1 up-regulation.....	156
4.2.5.6	Bap-induced NtBI-1 up-regulation requires a minimal exposure time.....	157
4.2.5.7	NtBI-1 protein accumulation is not sensitive to modulations of Ca <sup>2+</sup> homeostasis.....	160
4.2.6	Discussion.....	164
4.2.6.1	Induction of a stress response by CKs in tobacco cells involves NtBI-1 ...	164

4.2.6.2	Bap influences post-transcriptional regulation of NtBI-1.....	164
4.2.6.3	Signalization leading to induction of stress and cell death.....	166
4.2.6.4	NtBI-1 modulation, Ca <sup>2+</sup> signaling and other considerations.....	169
4.2.7	Acknowledgements.....	170
4.2.8	References.....	171
5	Discussion.....	180
5.1	Le gène <i>BI-1</i> est conservé dans l'évolution.....	180
5.2	L'effet anti-Bax de BI-1 est conservé dans l'évolution.....	183
5.3	BI-1 est un régulateur négatif de la PCD chez des organismes évolutivement distants.....	184
5.4	Modulation de l'ARNm de BI-1 en conditions de stress et de PCD : qu'est-ce que cela veut dire?.....	186
5.5	BI-1, autophagie et sénescence.....	188
5.6	Toxicité des CK.....	191
5.7	Régulation post-transcriptionnelle de BI-1.....	192
5.8	Vers un mécanisme d'action de BI-1 : régulation des flux de Ca <sup>2+</sup> intracellulaires.....	193
5.9	Conclusions générales et perspectives.....	198
	Bibliographie.....	199

## Liste des tableaux

Tableau 1-1 : Définitions des termes associés à la PCD animale.....	6
Table 4-1: Effect of various phytohormones and H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> on NtBI-1 expression and cell fate. .....	149
Table 4-2 : Viability decrease in tobacco cells treated with various CKs. ....	150
Table 4-3 : Growth reduction of tobacco cells treated with various CKs.....	151

## Liste des figures

Figure 1-1 : L'autophagie chez les mammifères. ....	8
Figure 1-2 : Représentation schématique simplifiée des principaux modes d'activation des caspases. ....	12
Figure 1-3 : Classification des membres de la famille Bcl-2. ....	15
Figure 1-4 : Le <i>permeability transition pore</i> (PTP) mitochondrial. ....	17
Figure 1-5 : Représentation schématique de certaines composantes impliquées dans les interactions entre le RE et les mitochondries au cours des processus apoptotiques initiés par le $Ca^{2+}$ . ....	22
Figure 1-6 : Un aperçu de la PCD dans la vie des angiospermes. ....	30
Figure 1-7 : La fleur chez les angiospermes. ....	32
Figure 1-8 : Micrographies électroniques à balayage présentant un exemple d'aérenchyme et de <i>tracheary element</i> (TE). ....	41
Figure 1-9 : La PCD pendant la différenciation des <i>tracheary elements</i> (TE). ....	43
Figure 1-10 : Complexité des interactions hormonales dans le contrôle de la PCD végétale en relation avec les ROS. ....	56
Figure 1-11 : Structure chimique des phytohormones impliquées dans la PCD végétale. ....	57
Figure 1-12 : Représentation schématique des <i>two-component response system</i> (TCS) bactériens et eucaryotes. ....	65
Figure 1-13 : La transduction de signal par les cytokinines <i>via</i> le phospho-relais à plusieurs étapes. ....	66
Figure 1-14 : Représentation schématique des sentiers majeurs de transport du $Ca^{2+}$ ayant été identifiés chez <i>A. thaliana</i> . ....	69
Figure 2-1 : Comparison of plant and animal BI-1 deduced amino acid sequences. ....	104
Figure 2-2 : Accumulation of BnBI-1 and NtBI-1 transcripts in plant organs. ....	105
Figure 2-3 : Death assays in human 293 cells. ....	106
Figure 2-4 : Localization microscopy of BnBI-1GFP in plant and yeast cells. ....	108
Figure 2-5 : Immunofluorescence images revealing the membrane topology of BnBI-1GFP in differentially permeabilized tobacco cells. ....	111
Figure 3-1 : Immunodetection of pBI-1 in plant leaves and cultured cells. ....	129
Figure 3-2 : Representative fields showing the effects of NtBI-1 down regulation on tobacco BY-2 cell morphology. ....	131
Figure 3-3 : Death assessment in AS and control cell lines upon suc starvation. ....	132
Figure 3-4 : DNA fragmentation analysis in AS and control cell lines following transfer to suc-free or man medium. ....	134
Figure 4-1 : NtBI-1 protein accumulation is increased by CKs but decreased by aging. ....	153
Figure 4-2 : Bap-induced modulation of NtBI-1 is different at the protein and mRNA level. ....	155
Figure 4-3 : Inhibition of intracellular Bap phosphorylation affects NtBI-1 accumulation. ....	158
Figure 4-4 : Short Bap treatments demonstrate the importance of a minimal exposure time for the observation of NtBI-1 over-accumulation and growth impairment. ....	159
Figure 4-5 : Bap and Kin induce a rapid and transient cytosolic $Ca^{2+}$ flux. ....	161

Figure 4-6 : Inhibition of Bap-induced $\text{Ca}^{2+}$ fluxes do not interfere with NtBI-1 over-accumulation but partially restores cell viability. ....	163
Figure 4-7 : Schematic representation of the relative effects of 0-50 $\mu\text{M}$ Bap on growth, cell survival, accumulation of the NtBI-1 protein as well as accumulation of PR1a and NtBI-1 mRNAs in tobacco Xanthi cells. ....	165
Figure 5-1 : Schéma récapitulatif de certaines caractéristiques structurales putatives des homologues végétaux de BI-1 au sein des membranes du RE. ....	181
Figure 5-2 : Résumé des relations entre les CK, le $\text{Ca}^{2+}$ et BI-1 chez les animaux et/ou les végétaux. ....	197

## Liste des abréviations

$\Delta\Psi_m$  : différence de potentiel membranaire mitochondrial

a.a. : acide aminé

ABA : acide abcissique

ACC : acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique

Adk : adénosine kinase

AdkI : inhibiteur d'adénosine kinase

ADNc : ADN complémentaire

AIF : *apoptosis-inducing factor*

AJ (JA) : acide jasmonique

ANT : *adenine nucleotide transporter*

AOX : *alternative oxidase*

ARR : *Arabidopsis thaliana response regulator*

AS (SA) : acide salicylique

Asp : résidu aspartate

Bad-MP : benzyladénosine monophosphate

Bap : 6-benzylaminopurine

Bapta : 1,2-Bis(2-aminophenoxy) éthane-*N,N,N',N'*- acide tétraacétique

BH : *Bcl-2 homology*

BI-1 : *Bax inhibitor-1*

BSA : albumine sérique de boeuf

CAD : *caspase-activated DNase*

CK : cytokinine

CKX : cytokinine oxydase/déshydrogénase

CS : *carbone starvation*

CysEP : cystéine endopeptidase

Cytc : cytochrome *c*

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

DD : *death domain*

DED : *death effector domain*

EDTA : *ethylene diamine tetraacetic acid*

FADD : *Fas-associated death domain*

GA : acide gibbérellique

GFP : *green fluorescent protein*

GUS :  $\beta$ -glucuronidase

His : résidu histidine

HR : réponse hypersensible

iP : N<sup>6</sup>-(2-isopentényl)adénine

IP<sub>3</sub>R : récepteur d'inositol-3-phosphate

iPA : N<sup>6</sup>-(2-isopentényl)adénosine

Kin : kinétine

LMM : *lesion mimic mutant*

MME : membrane mitochondriale externe

MMI : membrane mitochondriale interne

MS : Murashige & Skoog

PARP : poly (ADP-ribose) polymérase

PBS : *phosphate buffered saline*

PCD : *programmed cell death*

PCR : *polymerase chain reaction*

PI : iodure de propidium

PMSF : *phenylmethyl sulfonide fluoride*

PR : *pathogenesis related*

PTP : *permeability transition pore*

PVDF : *polyvinylidene difluoride*

RD : réaction de défense

RE (ER): réticulum endoplasmique

ROS : *reactive oxygen species*

RR : *response regulator*

RyR : récepteurs de ryanodine

SAR : réponse systémique acquise

SDS : *sodium dodecyl sulfate*

SERCA : pompe *sarco-endoplasmic reticulum*  $Ca^{2+}$ -ATPase

TCS : *two-component response system*

TE : *tracheary element*

TM : domaine transmembranaire

TMV : *tobacco mosaic virus*

TNF (R) : *tumor necrosis factor (receptor)*

TRADD : *TNF receptor associated death domain*

TUNEL : *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling*

VDAC : *voltage-dependent anion channel*

VDCC : *voltage-dependent*  $Ca^{2+}$  *channel*

Zea : zéatine

# **CHAPITRE 1**

## **Introduction**

# 1 Introduction

## 1.1 Mort cellulaire programmée : un aperçu historique

La vie sur terre telle que nous la connaissons actuellement est le fruit de milliards d'années d'évolution et l'apparition de la première bactérie a certainement marqué le début de ce qui est devenu une lutte perpétuelle pour l'existence. Dans son traité historique *L'Origine des espèces* [1992 (1859)], Charles Darwin nous rappelle fort à propos que cette lutte pour la vie résulte nécessairement en la mort de certains individus, puisqu'il en naît plus que n'en peut supporter un territoire donné. Ainsi, bien que cela soit plutôt paradoxal, la mort est essentielle au maintien de la vie.

Si les observations de Darwin se limitaient aux organismes entiers, le même constat peut toutefois être appliqué à une échelle inférieure aux organes et aux cellules d'un être vivant. En effet, c'est la balance entre les différents choix qui s'offrent à chaque cellule (mitose, différenciation ou mort) qui fait en sorte qu'un organisme adulte et ses différents organes présentent un nombre constant de cellules (Melino, 2002). Bien que les deux premières options fassent l'objet d'intenses recherches depuis plus d'un siècle, ce n'est que depuis le milieu des années '80 que les scientifiques s'intéressent activement au sort ultime réservé à toutes ces cellules, la mort. Comme le faisait remarquer Leopold dans un article avant-gardiste traitant des fonctions de la sénescence dans le développement végétal, « cet événement du cycle de vie des plantes n'est discuté dans aucun ouvrage de physiologie végétale » (Leopold, 1961).

Le fait que la mort de certains tissus puisse être normale avait toutefois été reconnu au cours de la renaissance avec l'observation de la métamorphose des insectes et des amphibiens, mais il a fallu attendre l'essor du microscope (fin du XIXe siècle et début du XXe siècle) pour que des études de biologie du développement et de phytopathologie permettent l'apparition d'un concept de mort cellulaire physiologique et active. Et puisque le concept de mort cellulaire a d'abord nécessité la considération de la cellule comme étant l'unité de base de la vie, rappelons que le mot « cellule » a été utilisé pour la première fois

dans un sens biologique par Robert Hooke, alors qu'il décrivait en 1665 dans son traité *Micrographica* les éléments microscopiques constituant le liège et d'autres tissus végétaux (faisant alors référence à des « petites cavités séparées de murs »). Les premières cellules dont l'observation est rapportée dans l'histoire (bien que la théorie cellulaire en tant que telle n'ait été élaborée que 150 ans plus tard) étaient donc des cellules végétales mortes dont il ne restait que la paroi, suite à l'exécution d'un programme de mort. Jones (2001) nous rappelle que les premières preuves que la mort est un programme actif nous viennent entre autres des végétaux ; d'abord par l'exemple de cellules végétales infectées par un champignon, où la cellule participe activement à sa propre destruction (Allen, 1923), puis par des travaux sur la sénescence foliaire montrant que le noyau est requis pour la désintégration cellulaire (Yoshida, 1961). Leopold a également fait valoir auprès de la communauté scientifique la nécessité de la mort dans le développement végétal et les avantages évolutifs qu'elle concède (Leopold, 1961). Mais ce sont Lockshin et Williams, étudiant alors la métamorphose des papillons, qui ont reconnu ces événements de mort associés au développement comme étant « programmés » et nécessitant l'utilisation d'énergie et la transcription de gènes (Lockshin et Williams, 1965a, b, c). Ces travaux furent ainsi les premières fois où l'on parla de la « mort cellulaire programmée » (PCD) comme étant l'élimination délibérée de certaines cellules pour le mieux-être de tout l'organisme, nécessitant une participation cellulaire active. Par la suite, le terme « apoptose » a été proposé par Kerr et collaborateurs suite à l'observation des nombreuses similarités morphologiques lors de la mort de plusieurs types de cellules de mammifère, que ce soit au cours du développement normal ou dans des situations pathologiques (Kerr *et al.*, 1972 ; voir aussi la rétrospective de Kerr, 2002). Le terme « nécrose », habituellement utilisé à l'époque pour identifier tous les types 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 ». L'utilisation du terme « apoptose » a été introduite pour décrire un type de PCD qui « semble jouer un rôle opposé mais complémentaire à la mitose dans la régulation des populations cellulaires animales. Ses caractéristiques morphologiques suggèrent un phénomène actif, intrinsèquement programmé qui peut être initié ou inhibé par une variété de stimuli environnementaux, physiologiques ou pathologiques » (Kerr *et al.*, 1972, cité par Bursch *et al.*, 2000). Les caractéristiques morphologiques en question,

que l'on considère encore aujourd'hui comme caractéristiques de l'apoptose, sont la condensation du cytoplasme, le détachement des autres cellules dans les tissus, la fragmentation de la cellule (y compris le noyau) en « corps apoptotiques » délimités par une membrane sans qu'il y ait fuite du contenu cellulaire, suivi de la phagocytose des corps apoptotiques par les cellules avoisinantes ou des macrophages.

Bien que les propositions de Kerr et collaborateurs, basées sur des données morphologiques, aient permis une plus grande reconnaissance scientifique de l'importance du suicide cellulaire, l'intérêt pour l'apoptose et la PCD en général est demeuré plutôt faible, de sorte qu'il a fallu attendre l'établissement, dans les années '80, de bases génétiques du phénomène pour qu'il devienne un domaine de recherche en soi (Vaux, 2002). Ces bases sont venues de travaux avec le nématode *Caenorhabditis elegans* (chez lequel exactement 131 des 1090 cellules somatiques initiales meurent lors de son développement hermaphrodite), qui ont conduit à l'identification de toute une gamme de gènes spécifiques à la PCD du nématode et parallèlement des mammifères. À ce stade-ci, notons seulement le gène humain *Bcl-2*, qui est structurellement et fonctionnellement homologue à *Ced-4* du nématode (Vaux *et al.*, 1992) et le premier régulateur de l'apoptose à avoir été reconnu. Initialement identifié à cause de sa translocation chromosomique dans les lymphomes folliculaires humains, il a d'abord été assumé que *Bcl-2*, tout comme les autres oncogènes impliqués dans les translocations (e.g. *c-Myc*), stimulait la prolifération cellulaire. Or, des études de surexpression ont plutôt montré qu'il prévenait la mort, entre autres lors du retrait d'un facteur de croissance (Vaux *et al.*, 1988), démontrant ainsi non seulement le rôle de *Bcl-2* dans l'apoptose, mais également que les cancers humains pouvaient résulter de l'inhibition de la mort cellulaire et pas seulement de la stimulation de la prolifération. Les acteurs génétiques de la PCD chez *C. elegans* s'étant révélés conservés dans l'évolution, les découvertes chez le nématode ont été appliquées aux mammifères. Les années '90 devinrent alors « l'âge d'or » de l'apoptose, cette dernière se retrouvant impliquée dans des maladies auto-immunes et le développement général du système immunitaire (Strasser *et al.*, 1991), puis dans le SIDA et des maladies neuro-dégénératives, comme le Parkinson et l'Alzheimer (revu par Duke *et al.*, 1996).

Chez les végétaux, l'étude de la PCD n'a pas connu le même essor fantastique, mais a fait son bout de chemin. Étant donné son importance à toutes les étapes du développement de même qu'en réaction de défense envers les phytopathogènes, la PCD végétale est maintenant un domaine de recherche à part entière. La section suivante définira de façon globale les mécanismes moléculaires de la PCD animale et plus particulièrement l'apoptose (section 1.3), qui constituent en partie les bases de son pendant végétal. La PCD végétale sera ensuite survolée, autant d'un point de vue développemental que pathologique, avant de s'attaquer un peu plus en détails à certains paradigmes de cette science encore jeune (section 1.4).

## **1.2 PCD animale : diversité morphologique et autres considérations**

### **1.2.1 PCD vs nécrose**

Le concept de mort cellulaire « programmée » est en fait une définition opérationnelle qui implique la participation active de la cellule dans sa propre destruction (Tableau 1-1). Bien que ce processus requiert l'activité de gènes spécifiques, il faut cependant noter qu'il n'implique pas nécessairement la transcription et/ou la traduction *de novo*, mais peut simplement compter dans certains cas sur l'activation de protéines déjà synthétisées et conservées dans un état de latence, ou sur le recrutement de protéines occupées à d'autres fonctions.

Par opposition, la nécrose est le résultat d'une perte de contrôle rapide et/ou massive des ressources énergétiques ou de l'intégrité des barrières membranaires. Typiquement, elle est accompagnée d'un gonflement osmotique de la cellule et de ses organites (communément les mitochondries), puis éventuellement de la lyse et de l'arrachement des composés cytoplasmiques (voir entre autres les revues de Lockshin et Zakeri, 2002, 2004). La morphologie associée à ce type de mort est variable et mal définie, peut-être due à l'absence de participation active de la part de la cellule. En effet, contrairement à la PCD, la nécrose est un événement que la cellule subit et non un phénomène induit délibérément.

Considérant que la nécrose, contrairement à la PCD, entraîne le relâchement du contenu cellulaire dans l'espace intercellulaire (et conséquemment le recrutement du système immunitaire et une réponse inflammatoire), il n'est pas surprenant que la PCD soit la finalité la plus répandue. La nécrose est donc l'exception plutôt que la règle chez les animaux et de ce fait nous n'en traiterons pas plus longuement.

**Tableau 1-1 : Définitions des termes associés à la PCD animale.**

Adapté de Lockshin et Zakeri, 2004.

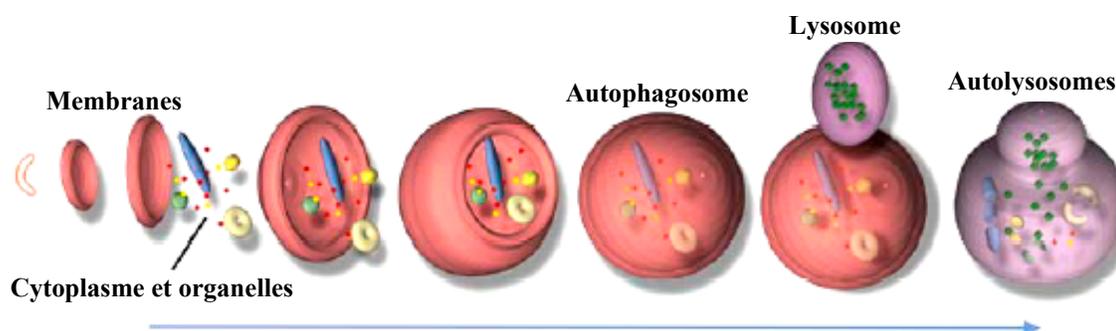
Terme	Définition
1- Nécrose	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Mort cellulaire apparemment incontrôlée</li> <li>-Perte d'ATP ou d'activités de pompes membranaires</li> <li>-Morphologie la plus commune : gonflement osmotique de la cellule et de ses organelles, avec relâchement du contenu cellulaire et précipitation des protéines</li> <li>-Réponse inflammatoire</li> </ul>
2- Mort cellulaire programmée	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Une séquence (potentiellement interruptible) d'événements contrôlés conduisant à la mort de la cellule</li> <li>-Associée au développement ou à des situations pathologiques</li> <li>-Requiert l'activité de gènes spécifiques (souvent l'activation de protéines existantes)</li> <li>-Pas de réponse inflammatoire (phagocytose)</li> </ul>
2-1 Apoptose	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Morphologie spécifique : condensation de la cellule, marginalisation de la chromatine et fragmentation du noyau, formation de corps apoptotiques, pas de gonflement des organelles (mis à part le RE)</li> <li>-Dégradation internucléosomale de l'ADN</li> <li>-Extériorisation des phosphatidylsérines</li> <li>-Activation de caspases comme la caspase 3</li> <li>-Démantèlement du cytosquelette</li> <li>-Pas de réponse inflammatoire (phagocytose)</li> </ul>
2-2 Lysosomale/ Type II / Autophagique	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Caractérisée morphologiquement par la formation de nombreuses vésicules autophagiques</li> <li>-Activation tardive des caspases ou caspases non activées</li> <li>-Principales protéases : cathepsines ou le protéasome</li> <li>-Fragmentation de l'ADN tardive ou absente</li> <li>-Extériorisation des phosphatidylsérines</li> <li>-Cytosquelette demeure intact</li> <li>-Pas de réponse inflammatoire (phagocytose)</li> </ul>

Comme cela est mentionné au Tableau 1-1, la PCD est associée à certaines étapes du développement normal des animaux, mais peut aussi être activée dans des situations pathologiques diverses. Par exemple, des cellules du système immunitaire reconnaissant des cellules infectées par un pathogène vont stimuler chez ces cellules corrompues l'activation d'un programme de mort (dans ce cas-ci l'apoptose). Dans d'autres cas, l'activation incontrôlée de la PCD dans les cellules neuronales peut être responsable de certaines maladies neurodégénératives. La PCD associée aux pathologies peut donc être à la fois bénéfique et détrimentale, selon les cas.

### **1.2.2 PCD : apoptotique ou autophagique ?**

Nous avons déjà spécifié dans notre aperçu historique (section 1.1) le contexte dans lequel le mot apoptose a été associé à la PCD. Ainsi, la définition de l'apoptose reposait à l'origine strictement sur des caractères morphologiques spécifiques (Kerr *et al.*, 1972). Ultérieurement, l'extériorisation active des phosphatidylsérines a été identifiée comme étant l'un des signaux pour la phagocytose et ainsi considérée comme l'un des marqueurs de l'apoptose. De même, la marginalisation de la chromatine a été associée à un clivage contrôlé de l'ADN au niveau internucléosomal, qui peut être détecté par gel d'électrophorèse (produisant des « échelles d'ADN » caractéristiques dues à la génération de fragments étant des multiples de 180-190 pb) ou par marquage *in situ* (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling*; TUNEL). La fragmentation du génome est considérée comme un moyen de rendre le programme de mort irréversible et facilite par le fait même le démantèlement du noyau pour son incorporation dans les corps apoptotiques. Le démantèlement du reste de la cellule et la morphologie typique qui l'accompagne sont quant à eux assurés entre autres par les caspases, une classe de cystéine protéases dont l'activation est presque considérée comme synonyme de l'apoptose (voir section 1.3.2). Il est à noter que lorsque observée dans des cellules cultivées *in vitro*, l'apoptose se termine par une phase nécrotique, puisque la phagocytose par les macrophages ou les cellules avoisinantes n'a pas lieu (Kaufmann et Hengartner, 2001; Vaux, 2002).

La PCD peut aussi se présenter sous d'autres formes, en l'occurrence la PCD dite lysosomale, de type II ou autophagique, ces trois termes désignant tous un même type de PCD (Tableau 1-1). En réalité, avant la découverte des caspases et leur étroite association avec l'apoptose, la plupart des cas de mort cellulaire étudiés étaient considérés comme étant lysosomaux (Lockshin, 1969) ou de « Type II » (Schweichel et Merker, 1973), nécessitant l'activation du compartiment lysosomal. Appelé ultérieurement mort cellulaire autophagique, ce type de mort cellulaire est caractérisé morphologiquement par une abondante formation de vacuoles autophagiques (autophagosomes) qui résultent de la séquestration de portions du cytoplasme (incluant des organelles) à l'intérieur d'une vésicule pourvue d'une double membrane, et de sa fusion subséquente aux lysosomes, qui fournissent les hydrolases (voir Figure 1-1).



**Figure 1-1 : L'autophagie chez les mammifères.**

La formation de vacuoles autophagiques (autophagosomes) résulte de la séquestration de portions du cytoplasme (incluant des organelles) à l'intérieur d'une vésicule pourvue d'une double membrane (en rose). Les autophagosomes fusionnent ensuite aux lysosomes (en violet), qui fournissent les hydrolases (en vert), pour former des autolysosomes. Chez la levure et les végétaux, l'autophagosome fusionne plutôt avec la vacuole. Tiré de Yoshimori (2004).

La mort autophagique ne répondant pas à tous les critères de l'apoptose, elle a souvent été cataloguée à tort de nécrose, amenant certaines confusions. De même, de nombreux cas de PCD animale ont été qualifiés d'apoptose sur la simple base qu'ils impliquaient l'activation de processus cellulaires, alors qu'il pourrait s'agir en fait de mort par autophagie (voir les revues de Slovirer, 2002; Abraham et Shaham, 2004; Lockshin et Zakeri, 2004). Ces confusions proviennent du fait que la découverte des caspases et de leur activation pour le

démantèlement cellulaire apoptotique a imposé le dogme de l'apoptose pendant les années '80 et '90. La prépondérance a été telle que le mot apoptose était (et est parfois encore, surtout chez les végétaux) négligemment utilisé pour désigner la PCD. Ainsi, au moment où la présente thèse a été entreprise en 1999, il n'était pas rare de retrouver dans la littérature scientifique, les ouvrages de référence ou les catalogues de différentes compagnies l'utilisation du mot apoptose pour désigner la PCD. La formule « *Programmed cell death, or apoptosis, is ...* » a été malheureusement très répandue, laissant un lecteur non averti croire que les deux termes étaient synonymes, ce qui est faux. Bien que l'apoptose constitue indubitablement une forme de PCD, la définition de la PCD ne se limite pas à celle de l'apoptose, comme en témoigne l'existence de l'autophagie. En réalité, certains cas de PCD classiquement considérés autophagiques semblent avoir recours à l'apoptose dans les derniers stades, y compris l'activation des caspases, et le premier stade autophagique pourrait constituer un moyen de diminuer la masse cellulaire à éliminer (Abraham et Shaham, 2004; Lockshin et Zakeri, 2004). Il a ainsi été suggéré que l'apoptose et l'autophagie pourraient constituer les deux extrêmes de la PCD entre lesquels se retrouverait un continuum de différentes formes ayant recours à certains éléments de l'un et l'autre de ces extrêmes (voir entre autres Guimarães et Linden, 2004; Lockshin et Zakeri, 2004).

## **1.3 Apoptose - mode d'emploi**

Le paradigme de l'apoptose, cette forme très répandue mais surtout très étudiée de PCD animale, est un incontournable pour quiconque s'intéresse de près ou de loin à la PCD. Dans cette section, les mécanismes moléculaires régissant le contrôle et l'exécution de l'apoptose chez les mammifères seront présentés de façon succincte et non exhaustive de façon à être ensuite en mesure d'apprécier toute la complexité de la PCD végétale.

### **1.3.1 Préliminaires**

Dans un premier temps, rappelons que l'apoptose est une forme physiologique de mort cellulaire qui a évolué chez les animaux pour permettre l'homéostasie et le remodelage

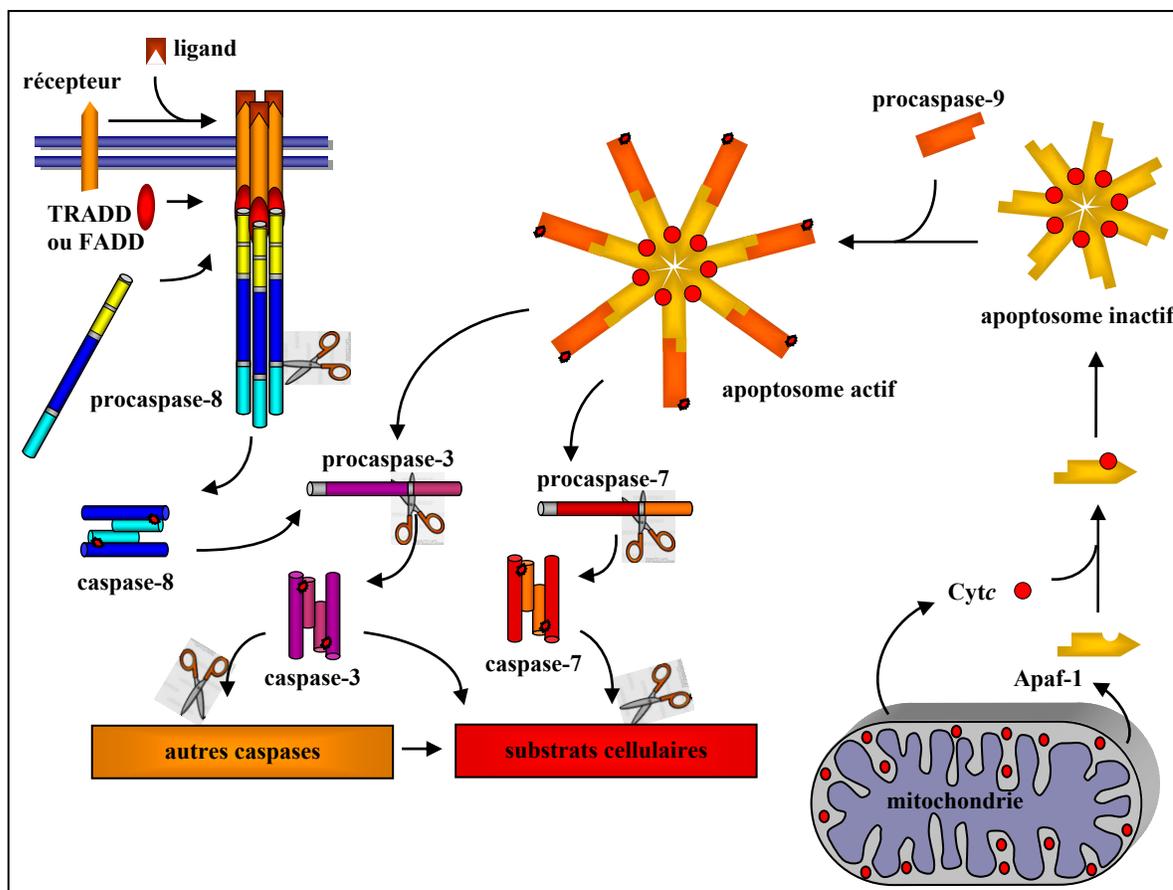
tissulaire, ainsi que pour éliminer des cellules superflues et potentiellement dangereuses pour l'organisme. Par exemple, l'apoptose est essentielle à l'élimination des cellules auto-immunes ainsi que les cellules potentiellement cancéreuses présentant une prolifération incontrôlée. L'apoptose est caractérisée par la destruction ordonnée de certaines protéines et de l'ADN cellulaire, rendant les cellules prêtes à être éliminées en dernier lieu par la phagocytose (Sprick et Walczak, 2004).

L'activation de l'apoptose peut se faire par deux sentiers principaux, soit un sentier dit « extrinsèque », faisant appel à l'activation de récepteurs localisés au niveau de la membrane plasmique, et un sentier « intrinsèque », faisant appel à l'activité des membres de la famille Bcl-2 au niveau des mitochondries. Malgré leur mode d'initiation différents, les deux sentiers ont la même finalité : l'activation de la cascade des caspases, les enzymes protéolytiques principalement responsables du démantèlement de la cellule, dont il sera question en premier lieu.

### **1.3.2 Caspases**

Les caspases sont caractérisées par la présence d'un résidu cystéine dans leur site actif, de même que par le clivage de leur substrat après un résidu aspartate (une spécificité très rare chez les autres classes de protéases), de sorte qu'elles ont été désignées sous le terme « caspases ». De même, la détermination de leur structure tertiaire a révélé une topologie unique désignée repliement caspase-hémoglobine. Les caspases impliquées dans l'apoptose peuvent être subdivisées en deux classes, soit les caspases initiatrices (caspase-2, -8, -9 et -10), responsables du déclenchement des cascades d'activation des caspases, et en caspases effectrices (caspases-3, -6 et -7), véritables responsables de la destruction cellulaire au cours de l'apoptose. Elles sont toutes produites sous forme d'un grand précurseur inactif (procaspase) qui demeure latent dans la cellule, et elles sont activées lorsque nécessaire par clivage (voir Figure 1-2). Les procaspases contiennent trois domaines : un pro-domaine en N-terminal, une grosse sous-unité d'environ 20 kDa (p20) et une petite sous-unité d'environ 10 kDa (p10). Suite à la libération par clivage des sous-unités p10 et p20, celles-ci s'associent en complexes comprenant chacun deux grosses et

deux petites sous-unités, qui constituent la forme active des caspases. Contrairement aux caspases effectrices, les caspases initiatrices ont généralement un long pro-domaine qui est impliqué dans les interactions protéine-protéine nécessaires au recrutement des procaspases dans un complexe d'activation. La proximité des procaspases dans ces complexes suffit pour que leur faible activité protéolytique intrinsèque permette leur clivage mutuel et la libération de leurs sous-unités. Une fois activées, les caspases initiatrices activent à leur tour les caspases effectrices, ces dernières pouvant contribuer à amplifier le signal apoptotique par le clivage d'autres procaspases initiatrices. Les caspases effectrices ont entre autres pour cible les lamines nucléaires, les protéines du cytosquelette, la CAD (*caspase-activated DNase*, responsable de la fragmentation internucléosomale de l'ADN nucléaire), etc. (voir les revues de Salvesen et Dixit, 1999; Chang et Yang, 2000; Creagh et Martin, 2001; Degterev *et al.*, 2003).



**Figure 1-2** : Représentation schématique simplifiée des principaux 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 (apoptosome) formé d'Apaf-1 et du cytochrome *c* (Cyt $c$ ) suite à leur sortie des mitochondries (à droite). En présence de leur ligand, les récepteurs de mort s'agglomèrent en trimères et recrutent à leur face cytoplasmique la procaspase-8 ou -10 *via* l'intermédiaire de protéines adaptatrices (telles que TRADD et FADD). L'activation des caspases (sauf dans le cas de la procaspase-9 au sein de l'apoptosome) implique leur clivage en deux sous-unités (une grande p20 et une petite p10) qui s'associent en complexes comprenant chacun deux grosses et deux petites sous-unités. 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. Voir le texte pour d'autres détails. Tiré de Ouellet (2004) avec modifications.

### 1.3.3 Les récepteurs de mort

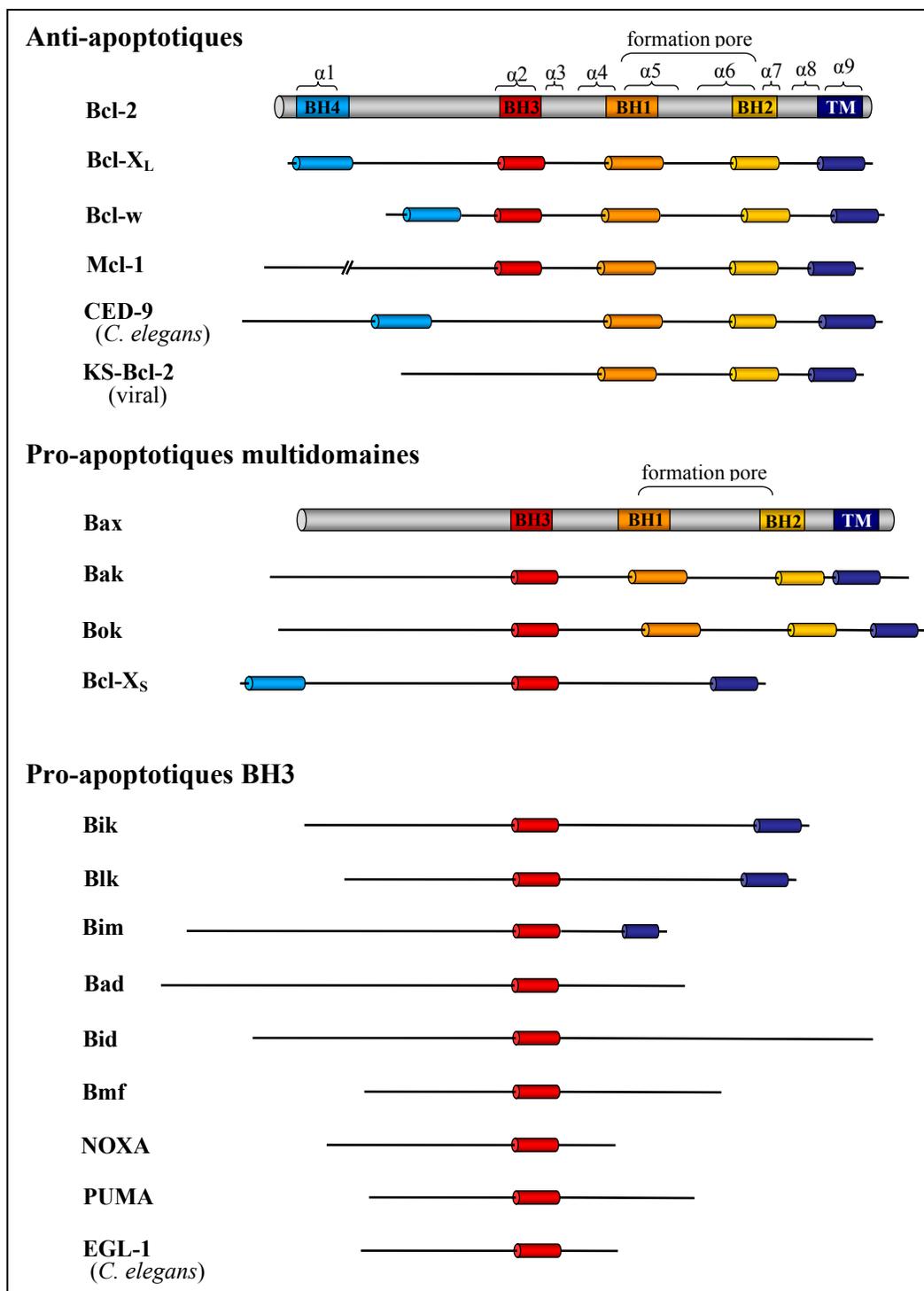
L'activation des caspases par le sentier extrinsèque (« de l'extérieur », voir Figure 1-2) fait appel à la stimulation de certains récepteurs de surface membres de la super famille du TNFR (*tumor necrosis factor receptor*) et appelés communément les « récepteurs de mort » (*death receptors*). En présence de leur ligand, ces récepteurs s'agglomèrent en trimères et recrutent à leur face cytoplasmique la procaspase-8 ou -10 *via* des protéines adaptatrices (telles que TRADD et FADD). Ces interactions protéine-protéine sont possibles grâce à la présence de domaines d'interaction : le domaine DD (*death domain*) est présent au niveau de la portion cytoplasmique du récepteur et interagit avec le DD de la protéine adaptatrice, qui contient également un domaine DED (*death effector domain*), qui à son tour peut interagir avec le DED présent sur le long pro-domaine des procaspases-8 et -10. Tel que décrit au paragraphe précédent, la proximité des procaspases au sein du mégacomplexe favorise leur clivage mutuel (voir les revues de Ashkenazi et Dixit, 1997; Wajant, 2002; Wang et El-Deiry, 2003; Sprick et Walczak, 2004).

### 1.3.4 Les mitochondries à l'origine des condamnations

D'autre part, le sentier intrinsèque (« de l'intérieur ») menant à l'activation de la cascade de caspases a comme point central l'établissement d'un complexe d'activation de la caspase-9, l'apoptosome, dont la formation est régulée par les mitochondries. Celles-ci jouent un rôle clé dans la régulation de l'apoptose (et dans la mort cellulaire en général). Elles collectent de l'information sur différents aspects du métabolisme cellulaire et des cascades de transduction de signal, intègrent cette information, puis décident du sort de la cellule et participent à l'exécution des condamnations à mort (Ferri et Kroemer, 2001). Suivant l'intégration de différents « stimuli de mort » (comme par exemple la perception de drogues cytotoxiques, des radiations UV, l'absence de cytokines ou de facteurs de croissance, le détachement de la cellule de la matrice extracellulaire, etc.), la membrane mitochondriale externe (MME) devient perforée due à la formation de pores (voir un peu plus loin dans cette section) et donc perméable à certaines protéines normalement séquestrées dans l'espace intermembranaire (EIM). Parmi celles-ci se trouve entre autres le

cytochrome *c* (*cytc*) qui en présence d'ATP peut se lier avec Apaf1 (*apoptotic protease activating factor-1*) pour le recrutement de procaspases-9, formant un très gros complexe appelé apoptosome (Figure 1-2). C'est au sein de l'apoptosome que la procaspase-9 peut être activée, grâce à l'interaction de son domaine CARD (*N-terminal caspase-recruitment domain*) avec celui d'Apaf1, sans nécessiter le clivage de l'holoenzyme (revu par Saelens *et al.*, 2004).

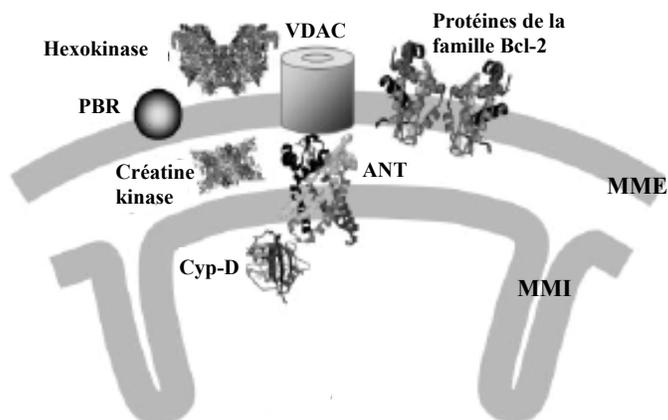
L'intégrité de la MME est contrôlée entre autres par les protéines membres de la famille Bcl-2 (voir les revues de Gross *et al.*, 1999; Adams et Cory, 2001; Antonsson, 2001; Borner, 2003). L'implication de la protéine Bcl-2 dans la régulation de l'apoptose a été brièvement mentionnée à la section 1.1. En fait, la découverte de Bcl-2 a pavé la voie à l'identification de toute une famille de gènes codant pour des protéines impliquées dans la régulation positive ou négative de l'apoptose. Ces protéines sont caractérisées par des homologies de séquence dans de courtes régions conservées nommées domaines BH (*Bcl-2 homology*) (Figure 1-3). Alors que *C. elegans* ne possède que deux membres de cette famille, une trentaine de membres ont été identifiés chez les mammifères, témoignant d'une régulation de l'apoptose beaucoup plus complexe. Les protéines de la famille Bcl-2 sont classées selon leur fonction pro- ou anti-apoptotique et selon le nombre de domaine BH dont elles disposent. Elles ont ainsi été classées en trois catégories ; l'une est formée des protéines anti-apoptotiques et les deux autres catégories se partagent les pro-apoptotiques « multidomaines » et les pro-apoptotiques « BH3 seulement » (Figure 1-3). Comme leur nom l'indique, ces dernières ne possèdent que le domaine BH3. Plusieurs protéines de la famille possèdent en plus un domaine transmembranaire (TM) en C-terminal ( $\alpha 9$ ) qui permet leur localisation aux membranes des organites, comme la mitochondrie et le réticulum endoplasmique (RE), où elles exercent leur action. Malgré une quantité impressionnante de publications à ce sujet, les mécanismes exacts par lesquels les membres de la famille Bcl-2 contrôlent la perméabilité membranaire mitochondriale font encore l'objet de controverses (voir les revues de Gross *et al.*, 1999; Borner, 2003; Petros *et al.*, 2004, et le paragraphe suivant).



**Figure 1-3 : Classification des membres de la famille Bcl-2.**

Seulement certains membres représentatifs sont montrés et sont retrouvés chez les mammifères, sauf mention contraire. Les domaines *Bcl-2* homology (BH) et les segments transmembranaires (TM) sont indiqués. La position des hélices  $\alpha$  est montrée pour Bcl-2, ainsi que la région responsable de la formation de pores au sein des membranes. Voir le texte pour d'autres détails. Tiré de Ouellet (2004).

Quoi que la similarité entre les différents membres de la famille Bcl-2 soit restreinte aux domaines BH, il n'en demeure pas moins que ces protéines possèdent des structures tridimensionnelles remarquablement similaires. Brièvement, cette structure consiste en deux hélices hydrophobes centrales ( $\alpha 5$  et  $\alpha 6$ ) entourées de six ou sept hélices amphipathiques, formant une structure étrangement similaire à celle des domaines de formation de pores de certaines toxines bactériennes. En fait, les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub> et la pro-apoptotique Bax peuvent toutes former des pores au sein de membranes artificielles, et ce grâce aux hélices hydrophobes  $\alpha 5$  et  $\alpha 6$ , mais il n'est tout de même pas clair si un tel processus a vraiment lieu *in vivo*. Il faut également souligner qu'outre leur capacité à former des canaux ioniques membranaires *de novo*, les membres pro-apoptotiques tels que Bax et Bid (tBid) pourraient aussi contribuer à la perméabilisation de la MME *via* la déstabilisation de la structure lipidique. Un autre modèle populaire est celui où les pro-apoptotiques (multidomaines) collaboreraient plutôt avec d'autres protéines de la membrane mitochondriale pour former des canaux chimériques. Dans ce modèle, certains membres de la famille Bcl-2 pourraient réguler de façon positive (pro-apoptotiques) ou négative (anti-apoptotiques) l'activité du PTP (*permeability transition pore*) mitochondrial. Le PTP traverse les deux membranes mitochondriales aux sites de contact et transporte l'ADP, l'ATP et d'autres petites molécules (< 1500 Da). Bien que les composantes moléculaires de ce pore soient encore imprécises, il est à tout le moins composé du VDAC (*voltage-dependent anion channel*) à la MME, du ANT (*adenine nucleotide transporter*) à la membrane mitochondriale interne (MMI) et de la cyclophiline D dans la matrice mitochondriale (Figure 1-4). L'ouverture du PTP peut entraîner le gonflement de la mitochondrie, la dépolarisation de la MMI et le découplage de la phosphorylation oxydative résultant en la perte de la synthèse d'ATP et la production de formes réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species*; ROS). Les pro-apoptotiques pourraient s'associer au PTP et permettre ainsi le passage de molécules beaucoup plus grosses qu'à l'habitude (Brookes *et al.*, 2004).



**Figure 1-4 : Le *permeability transition pore* (PTP) mitochondrial.**

Les composantes putatives du pore sont présentées, bien que leur arrangement exact les unes par rapport aux autres ne soit pas connues. ANT : adenine nucleotide transporter; PBR : *peripheral benzodiazepine receptor*; VDAC : voltage-dependent anion channel; Cyp-D : cyclophiline D. MME : membrane mitochondriale externe; MMI : membrane mitochondriale interne. Tiré de Brookes *et al.* (2004).

Plusieurs protéines de l'espace intermembranaire sont effectivement relâchées durant l'apoptose, possiblement mais pas nécessairement *via* le PTP. Outre le cytc dont il a déjà été mentionné, notons AIF (*apoptosis-inducing factor*) et l'endonucléase G, toutes deux contribuant aux dommages à l'ADN nucléaire de façon indépendante des caspases. Notons également Smac/DIABLO et la sérine protéase HtrA2/OMI, qui antagonisent les inhibiteurs de caspases IAPs (*inhibitor of apoptosis*), favorisant ainsi l'activation des caspases. Cependant, ces deux protéines peuvent aussi provoquer la PCD indépendamment des caspases *via* des mécanismes encore inconnus (voir les revues de Borner, 2003; Saelens *et al.*, 2004; Sharpe *et al.*, 2004).

#### 1.3.4.1 Bax – *natural born killer*

Les interactions protéine-protéine entre les différents membres de la famille sont aussi très importantes pour leur activité. L'exemple classique est celui où un excès de Bax entraîne la cellule vers la mort, mais la co-expression de Bcl-2 ou Bcl-X<sub>L</sub> neutralise cet effet. Il a donc été suggéré que les niveaux relatifs des membres pro- et anti-apoptotiques pourraient

constituer un « rhéostat » régulant le seuil apoptotique de la cellule. La formation d'homo- ou hétérodimères entre les membres de la famille a lieu au sein des membranes, et ce *via* le domaine BH3. Les anti-apoptotiques présentent un sillon hydrophobe proéminent à leur surface, qui est le site de liaison du domaine BH3 de différentes protéines pro-apoptotiques telles que Bax et Bad. Les pro-apoptotiques qui ne sont pourvus que d'un domaine BH3 pourraient donc avoir évolué de façon à réguler (neutraliser) les membres anti-apoptotiques (voir les revues de Gross *et al.*, 1999; Borner, 2003; Petros *et al.*, 2004).

Le cas du pro-apoptotique Bax constitue un bon exemple de la régulation de la perméabilité membranaire par des interactions protéine-protéine. Dans les cellules saines, Bax se retrouve principalement sous forme de monomère dans le cytosol (environ 60%) ou attaché lâchement à la MME. Suivant un signal apoptotique, il y a translocation de la protéine à la mitochondrie grâce à un changement de conformation qui résulte en la libération de son domaine TM ( $\alpha 9$ ) et l'insertion de celui-ci dans la MME. Le domaine C-terminal (TM) est normalement replié dans le sillon hydrophobe de Bax, mais le changement de conformation associé à son déploiement expose le domaine BH3, permettant la formation d'oligomères, ou sa liaison à un anti-apoptotique ou à d'autres pro-apoptotiques (Borner, 2003; Petros *et al.*, 2004).

Il apparaît donc que les mécanismes moléculaires responsables des activités pro- et anti-apoptotiques des membres de la famille Bcl-2 pourraient être une combinaison d'interactions protéine-protéine et de la formation/modulation de pores ou canaux membranaires. Étant donné que plusieurs membres de la famille partagent une structure similaire, il est fort probable que ce soit leur diversité de séquence qui détermine leur préférence quant au choix de leurs partenaires protéiques.

### 1.3.5 Le rôle du $\text{Ca}^{2+}$ et du réticulum endoplasmique

#### 1.3.5.1 Généralités

Le  $\text{Ca}^{2+}$  est un second messager intracellulaire important et son action au sein de différents sentiers est bien connue, mais ce n'est que depuis quelques années que son rôle dans la PCD est si activement étudié. L'implication du  $\text{Ca}^{2+}$  dans la PCD a commencé à être reconnue dès les années '70 (Fleckenstein *et al.*, 1974) et plusieurs études récentes ont démontré que des augmentations de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ) peuvent être observées au cours des stades précoces et tardifs du sentier apoptotique (Orrenius *et al.*, 2003). Il y a maintenant un consensus général sur le fait qu'une hausse de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  (qui se situe normalement autour de 100-200 nM en conditions physiologiques) peut être responsable des événements subséquents menant au démantèlement cellulaire (Ferrari *et al.*, 2002; Orrenius *et al.*, 2003). Parallèlement, le rôle du RE dans la régulation de l'apoptose a commencé à être dévoilé et il semble que cet organite soit de connivence avec les mitochondries, et ce dans un sentier de régulation mettant en vedette le  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### 1.3.5.2 Le lien RE-mitochondries

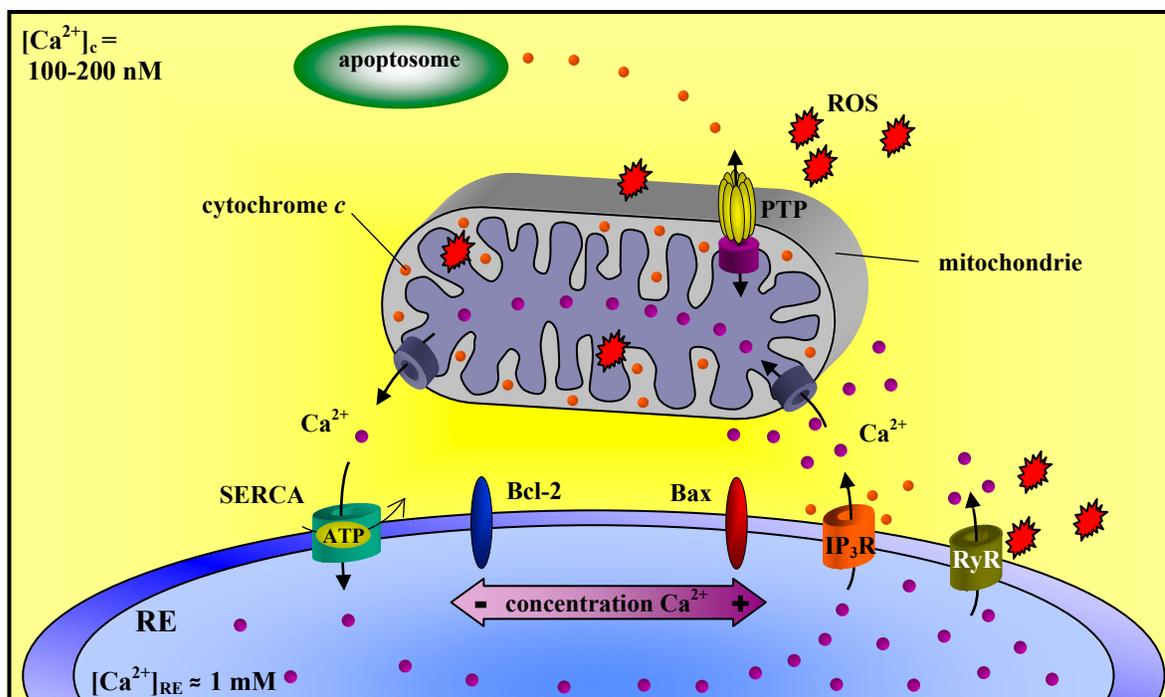
En tant que réservoir de  $\text{Ca}^{2+}$  (concentration d'environ 1 mM), le RE joue un rôle majeur dans les flux de  $\text{Ca}^{2+}$  associés à l'apoptose. De prime abord, rappelons que le RE constitue un organite hautement dynamique impliqué non seulement dans la synthèse et le repliement des protéines, mais aussi dans la signalisation associée à de nombreuses fonctions cellulaires. La signalisation par le  $\text{Ca}^{2+}$  associée au RE est assurée par la présence de récepteurs de ryanodine (RyR) et d'inositol-3-phosphate ( $\text{IP}_3\text{R}$ ), qui constituent des canaux calciques permettant le passage du  $\text{Ca}^{2+}$  lorsqu'en présence des seconds messagers ADP-ribose cyclique (ADPRc; pour les RyR) et  $\text{IP}_3$  (pour les  $\text{IP}_3\text{R}$ ; Berridge, 2002). Le  $\text{Ca}^{2+}$  peut également s'échapper du RE par des fuites (*leak pathway*) attribuables à la présence de pores servant à l'insertion des protéines nouvellement synthétisées à l'intérieur du RE (ces pores sont fermés de façon plus ou moins étanche par la présence d'un ribosome du côté cytosolique et la chaperonne BIP dans le lumen; Camello *et al.*, 2002). La sortie de  $\text{Ca}^{2+}$  du

RE est contrebalancée grâce à la pompe *sarco-endoplasmic reticulum*  $Ca^{2+}$ -ATPase (SERCA; Berridge, 2002).

Dans des conditions physiologiques, les mitochondries contribuent à la régulation de la  $[Ca^{2+}]_c$  en important celui-ci grâce à la force motrice provenant de leur différence de potentiel membranaire ( $\Delta\Psi_m$ ) négatif interne maintenu par la chaîne respiratoire (Carafoli, 2004; Szabadkai et Rizzuto, 2004). Ce cycle du  $Ca^{2+}$  dans les mitochondries est nécessaire au métabolisme mitochondrial, entre autres pour le bon fonctionnement de certaines déshydrogénases localisées dans la matrice et impliquées dans le cycle des acides tricarboxyliques et la phosphorylation oxydative (Carafoli, 2004). Une élévation de la concentration de  $Ca^{2+}$  dans les mitochondries ( $[Ca^{2+}]_m$ ) aura donc pour effet de favoriser l'activité de la chaîne respiratoire et conséquemment la génération d'ATP. Il semble donc que certains stimuli entraînant une hausse de la  $[Ca^{2+}]_c$  soient perçus au niveau mitochondrial *via* une hausse de la  $[Ca^{2+}]_m$ , ce qui entraîne une augmentation de la production d'ATP pour répondre aux besoins cellulaires, comme c'est le cas par exemple lors de la stimulation de cellules du cœur (cardiomyocytes) par les  $\beta$ -adrénergiques, où l'élévation de la  $[Ca^{2+}]_m$  fournit l'ATP nécessaire à la force contractile (Brookes *et al.*, 2004).

Bien que l'élévation de la  $[Ca^{2+}]_m$  soit généralement bénéfique pour la cellule, il arrive qu'elle ait aussi des effets négatifs, particulièrement en conditions pathologiques où la  $[Ca^{2+}]_c$ , et conséquemment la  $[Ca^{2+}]_m$ , deviennent très élevées. Le canal responsable de l'entrée du  $Ca^{2+}$  dans la mitochondrie (dont la nature moléculaire est encore inconnue) est très sélectif, mais n'a que peu d'affinité pour l'ion, de sorte que la concentration périmitochondriale en  $Ca^{2+}$  doit être de l'ordre du  $\mu M$  pour permettre l'ouverture du canal. Or, les mitochondries sont physiquement localisées tout près du RE (ou de la membrane plasmique où se trouvent d'autres canaux), se retrouvant ainsi au cœur de microdomaines cytosoliques où la  $[Ca^{2+}]_c$  peut être très élevée (Carafoli, 2004; Szabadkai et Rizzuto, 2004). Lorsque la cellule est soumise à des stress apoptotiques conduisant à la présence soutenue de tels microdomaines, la matrice mitochondriale ne fournit plus à tamponner tout ce  $Ca^{2+}$ ; le PTP s'ouvre alors et laisse fuir non seulement ce surplus de  $Ca^{2+}$  mais aussi plusieurs protéines cytotoxiques telles que le cytc (voir section 1.3.4 et la Figure 1-5) qui participe à

la formation de l'apoptosome et incidemment à l'activation de la cascade des caspases. De plus, le *cytc* peut aussi transloquer vers le RE et interagir avec les IP<sub>3</sub>R de façon à favoriser la sortie de Ca<sup>2+</sup> par ces canaux, générant ainsi une boucle de rétroaction positive menant à un relâchement généralisé du *cytc* et l'induction de l'apoptose (Boehning *et al.*, 2003). Les ROS générés par les dysfonctions mitochondriales peuvent aussi modifier la répartition du Ca<sup>2+</sup> cellulaire en activant les récepteurs RyR du RE par l'oxydation d'un résidu thiol, générant là encore une boucle d'autoamplification (Brookes *et al.*, 2004). Il faut cependant noter qu'il est possible que le *cytc* soit évacué des mitochondries par d'autres moyens que le PTP. De plus, bien que l'ouverture du PTP *in vitro* entraîne le gonflement des mitochondries et la rupture de la membrane externe, il est peu probable que cela entraîne la sortie du *cytc in vivo*, car ce gonflement des mitochondries n'est pas typiquement observé pendant l'apoptose (Brookes *et al.*, 2004).



**Figure 1-5** : Représentation schématique de certaines composantes impliquées dans les interactions entre le RE et les mitochondries au cours des processus apoptotiques initiés par le Ca<sup>2+</sup>.

La circulation du Ca<sup>2+</sup> entre le RE et les mitochondries fait partie des processus cellulaires normaux. Cette circulation repose sur la participation des canaux à Ca<sup>2+</sup> de la mitochondrie et du RE, dont IP<sub>3</sub>R et RyR, et la pompe Ca<sup>2+</sup>/ATPase du RE (SERCA). Lors de signaux apoptotiques affectant le RE, les canaux peuvent laisser sortir beaucoup de Ca<sup>2+</sup>, créant ainsi des microdomaines où la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> est suffisamment élevée pour permettre l'ouverture, au niveau des mitochondries, d'unopoteurs calciques de faible affinité. Un surplus soutenu de Ca<sup>2+</sup> entraîne l'ouverture du PTP mitochondrial, et conséquemment la sortie du cytc vers le cytosol où il va participer à la formation de l'apoptosome (voir section 1.3.2; le PTP ne semble pas avoir l'exclusivité pour le passage du cytc). Le cytc peut aussi interagir avec les IP<sub>3</sub>R pour augmenter la sortie de Ca<sup>2+</sup> du RE. L'entrée de Ca<sup>2+</sup> dans la mitochondrie de même que l'ouverture du PTP contribuent à dissiper le  $\Delta\psi_m$  et à générer des ROS, lesquels peuvent activer les RyR et amplifier la sortie de Ca<sup>2+</sup> du RE. La quantité de Ca<sup>2+</sup> en réserve au RE reflète la balance entre les membres pro- et anti-apoptotiques. D'une part, Bcl-2 contribue à diminuer la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>RE</sub> alors que Bax l'augmente, de sorte que la quantité de Ca<sup>2+</sup> pouvant être évacuée du RE en situation de stress se trouve respectivement diminuée et augmentée. Bcl-2 pourrait agir entre autres en diminuant l'activité de la SERCA ou en modifiant l'état de phosphorylation de IP<sub>3</sub>R. Consulter le texte pour plus de détails. Figure adaptée de Ouellet (2004).

### 1.3.5.3 La famille Bcl-2 en action au RE

Le fait que l'apoptose puisse être induite par une altération du flux de  $\text{Ca}^{2+}$  entre le RE et les mitochondries nous ramène aux fonctions régulatrices des protéines membres de la famille Bcl-2. En effet, plusieurs d'entre elles sont localisées et exercent leur fonction à la fois à la mitochondrie et au RE. Par exemple, Bax et Bak peuvent favoriser l'ouverture du PTP directement à partir de la MME (voir section 1.3.4). Cependant, 10-15% de ces deux pro-apoptotiques sont aussi localisées au RE, d'où elles peuvent favoriser la modulation à la hausse du niveau normal (*steady-state level*) de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ ) (Nutt *et al.*, 2002a; Nutt *et al.*, 2002b; Scorrano *et al.*, 2003; voir aussi la revue récente de Annis *et al.*, 2004). Conséquemment, une plus grande quantité de  $\text{Ca}^{2+}$  peut être relâchée du RE en situation de stress, et donc l'importation de  $\text{Ca}^{2+}$  par les mitochondries s'en trouve favorisée, augmentant les risques de saturation et d'ouverture du PTP menant à l'induction de l'apoptose (voir Figure 1-5).

À l'inverse, des antagonistes de l'apoptose tels que Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub> préviennent la formation du PTP en réponse à de nombreux signaux apoptotiques. Or, Bcl-2 peut être tout aussi efficace (dépendamment du stress) lorsque exprimée spécifiquement à la mitochondrie ou au RE (Rudner *et al.*, 2001). Considérant qu'environ le deux tiers de Bcl-2 endogène est localisée à la membrane du RE (Annis *et al.*, 2004), il n'est pas si surprenant qu'elle puisse exercer certaines de ses fonctions à partir de cet organite. En outre, l'action de Bcl-2 au RE implique une altération de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ . Contrairement au pro-apoptotique Bax, qui contribuerait à maintenir à la hausse la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ , Bcl-2 favoriserait plutôt un niveau plus faible (Foyouzi-Youssefi *et al.*, 2000; Pinton *et al.*, 2000; Vanden Abeele *et al.*, 2002; Breckenridge *et al.*, 2003b), ce qui aiderait à limiter la quantité de  $\text{Ca}^{2+}$  pouvant être évacuée du RE en situation de stress, et par conséquent pourrait aussi empêcher les surplus de  $\text{Ca}^{2+}$  aux mitochondries (voir les revues de Ferrari *et al.*, 2002; Rizzuto *et al.*, 2003).

Cette plus faible  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$  engendrée par la présence de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 au RE serait due à un effet indirect de Bcl-2 sur l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$ . En effet, des changements dans l'expression ou l'activité de certaines protéines impliquées dans la signalisation par le  $\text{Ca}^{2+}$  entraînent une augmentation de la perméabilité membranaire (*leak*)

du RE envers le  $\text{Ca}^{2+}$  (revu par Distelhorst et Shore, 2004). Par exemple, Vanden Abeele et collaborateurs (2002) ont montré que la surexpression de Bcl-2 est associée à une plus faible expression de la pompe SERCA (voir la section 1.3.5.2) et de la calréticuline, cette dernière séquestrant dans le lumen du RE de grandes quantités de  $\text{Ca}^{2+}$ . D'ailleurs, Bcl-2 peut interagir directement avec la SERCA et diminuer son activité, possiblement grâce à un changement de conformation de la SERCA (Dremina *et al.*, 2004). Plus récemment, Oakes et collaborateurs (2005) ont rapporté que les fuites de  $\text{Ca}^{2+}$  du RE pouvaient être le résultat d'un état d'hyperphosphorylation de  $\text{IP}_3\text{R}$ , une modification qui entraîne une augmentation la conductivité de ce canal envers le  $\text{Ca}^{2+}$ . Bcl-2 peut interagir directement avec ce canal, et la liaison est augmentée en l'absence de Bax et Bak, suggérant que les membres de la famille Bcl-2 puissent contrôler les fuites de  $\text{Ca}^{2+}$  du RE *via* la régulation du statut de phosphorylation de  $\text{IP}_3\text{R}$  (Oakes *et al.*, 2005).

Il est cependant important de noter que la modulation à la baisse de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$  par Bcl-2 demeure encore quelque peu controversée dû au fait que plusieurs études rapportent au contraire que Bcl-2 pourrait favoriser une augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$  (voir la rétrospective de Distelhorst et Shore, 2004). Ces différences peuvent potentiellement s'expliquer par l'utilisation de lignées cellulaires différentes, des différences dans les niveaux d'expression de Bcl-2, ou l'utilisation de méthodologies pouvant altérer différents aspects de la physiologie cellulaire (Annis *et al.*, 2004; Distelhorst et Shore, 2004). Au-delà de ces différences, des expériences connexes non reliées à Bcl-2 tendent à favoriser la première hypothèse (soit une diminution de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$  par Bcl-2). Ainsi, l'utilisation de la thapsigargine pour inhiber la SERCA au RE entraîne la sortie massive et rapide du  $\text{Ca}^{2+}$ , et par le fait même induit rapidement la PCD. De même, des manipulations qui provoquent une augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ , comme la surexpression de la calréticuline ou de la SERCA, rendent les cellules plus susceptibles à des stress apoptotiques (Ma *et al.*, 1999; Nakamura *et al.*, 2000; Arnaudeau *et al.*, 2002). Finalement, l'un des antagonistes préféré de Bcl-2, soit la protéine pro-apoptotique Bax, produit au contraire de Bcl-2 une augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ . À ce sujet, les travaux de Scorrano et collaborateurs (2003) méritent d'être mentionnés plus en détails. En effet, ces auteurs ont déterminé que des fibroblastes dérivés d'embryons de souris *knock-out* pour les gènes *bax* et *bak* présentent une plus faible  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$  que chez leur équivalent sauvage. Conséquemment, ces cellules

sont plus résistantes à de nombreux stress dont le mécanisme d'induction de la mort passe par l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_c$  (e.g. les second messagers lipidiques céramide et acide arachidonique, ou des stress oxydatifs). La surexpression de Bax ou de la pompe SERCA dans ces cellules *knock-out* permet de rétablir le niveau habituel de la  $[Ca^{2+}]_{RE}$ , mais lorsque Bax est spécifiquement dirigé à la mitochondrie, la  $[Ca^{2+}]_{RE}$  ne peut être rétablie, témoignant de l'importance de sa localisation pour l'exercice de ses fonctions. Sans entrer dans tous les détails, ajoutons toutefois que ces travaux ont permis non seulement de clarifier le rôle de Bax dans la régulation de la  $[Ca^{2+}]_{RE}$ , mais aussi de définir trois catégories de signaux apoptotiques en fonction de leur dépendance ou non envers le  $Ca^{2+}$  : 1) ceux (comme le stress oxydatif ou les second messagers lipidiques) nécessitant seulement le flux de  $Ca^{2+}$  aux mitochondries (bien que Bax puisse amplifier cet effet *via* sa localisation mitochondriale); 2) ceux qui impliquent directement les mitochondries et dépendent de la participation de Bax mais pas de la participation du  $Ca^{2+}$  (comme l'effet dirigé par la protéine pro-apoptotique Bid, qui doit interagir avec Bax à la mitochondrie pour exercer sa fonction létale); 3) et les signaux qui déclenchent à la fois les deux sentiers précédents, comme la staurosporine et l'étoposide (Scorrano *et al.*, 2003 et le commentaire de Demarex et Distelhorst, 2003).

Certains membres pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 exercent donc une partie de leurs activités au niveau du RE en modulant respectivement à la hausse ou à la baisse la  $[Ca^{2+}]_{RE}$ . Le niveau de  $Ca^{2+}$  au RE influence en retour la quantité pouvant être relâchée par les canaux calciques en situation de stress; plus la quantité évacuée est importante, plus grands sont les risques de saturation au niveau des mitochondries, ces dernières tamponnant les excès de  $Ca^{2+}_c$ . Un surplus soutenu de  $Ca^{2+}$  dans les mitochondries entraîne l'ouverture du PTP et potentiellement l'induction de l'apoptose (voir la Figure 1-5).

#### **1.3.5.4 Bax Inhibitor-1 : pas de la famille mais très impliqué**

D'autres protéines localisées au RE peuvent aussi avoir un effet pro- ou anti-apoptotique, en lien ou non avec la modulation de la  $[Ca^{2+}]_{RE}$  (voir les revues de Breckenridge *et al.*, 2003a; Annis *et al.*, 2004). Parmi celles-ci se trouve *Bax inhibitor-1 (BI-1)*, un gène originellement identifié chez l'humain grâce à la capacité de sa contrepartie protéique à

inhiber la mort cellulaire induite par Bax chez *Saccharomyces cerevisiae* (Xu et Reed, 1998). Avant cette étude par l'équipe de Reed, le gène *BI-1* était déjà reconnu sous le nom de *TEGT* (*testis enhanced gene transcript*), mais sa fonction n'avait pas été élucidée (Walter *et al.*, 1994; Walter *et al.*, 1995). Chez les levures *S. cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe*, la surexpression de certaines protéines pro-apoptotiques telles que Bax ou Bak produit un phénotype létal qui peut être inhibé par la coexpression de membres anti-apoptotiques comme Bcl-2 ou Bcl- $X_L$  (Zha *et al.*, 1996; Ink *et al.*, 1997). C'est par le criblage d'une banque d'ADNc humain transformée dans une souche de *S. cerevisiae* exprimant Bax sous le contrôle d'un promoteur inductible que l'effet anti-Bax de BI-1 a été révélé. En plus de contrecarrer l'action létale de Bax dans la levure, BI-1 exerce le même effet dans des cellules humaines en culture, similairement à Bcl-2 (Xu et Reed, 1998). Il est maintenant connu que ce gène code pour une protéine anti-apoptotique conférant non seulement une protection contre la surexpression de Bax, mais aussi envers un certain nombre de stimuli apoptotiques (Xu et Reed, 1998). Ce gène est surexprimé dans plusieurs cas de tumeurs malignes (Walter *et al.*, 1994; Jean *et al.*, 1999; Welsh *et al.*, 2001; Schmits *et al.*, 2002; van 't Veer *et al.*, 2002; Villalva *et al.*, 2002; Grzmil *et al.*, 2003), l'étiquetant ainsi en tant que régulateur de la mort cellulaire potentiellement impliqué dans la dérégulation de l'apoptose dans les cellules tumorales (Hückelhoven, 2004).

BI-1 est une protéine membranaire intégrale contenant six ou sept domaines transmembranaires. Elle est localisée principalement au niveau du RE et de l'enveloppe nucléaire et en plus faible proportion dans les membranes mitochondriales. D'autre part, BI-1 ne contient aucun des domaines conservés BH et peut s'associer *in vivo* avec Bcl-2 et Bcl- $X_L$ , mais non avec Bax ou Bak (Xu et Reed, 1998). Il apparaît donc que BI-1 n'inhibe pas Bax directement mais intervient plutôt dans un sentier en amont ou en aval de Bax. Cette protéine est particulièrement intéressante non seulement à cause de sa localisation au RE, qui suggère un rôle dans la signalisation par le  $Ca^{2+}$ , mais aussi à cause de sa conservation évolutive. En effet, des homologues végétaux (fonctionnellement équivalents à la protéine retrouvée chez les mammifères) ont été identifiés et caractérisés au cours des dernières années et certains domaines de la protéine sont même conservés chez les procaryotes (voir la revue récente de Hückelhoven, 2004). Le fait que cette protéine soit

présente chez les végétaux, pourtant dépourvus de Bax (voir section 1.4.4) laisse supposer qu'elle pourrait faire partie d'un sentier de mort conservé dans l'évolution. Ce sentier pourrait potentiellement mettre en vedette le  $\text{Ca}^{2+}$  et le RE, puisque l'équipe de Reed a démontré que BI-1 peut moduler la régulation du  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau du RE similairement à ce qui est observé lors de la surexpression de Bcl-2 ou en l'absence de Bax et Bak (voir section 1.3.5.3), c'est-à-dire que cette protéine contribue à diminuer la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$  (Chae *et al.*, 2004). Cet aspect sera abordé plus longuement au chapitre 5.

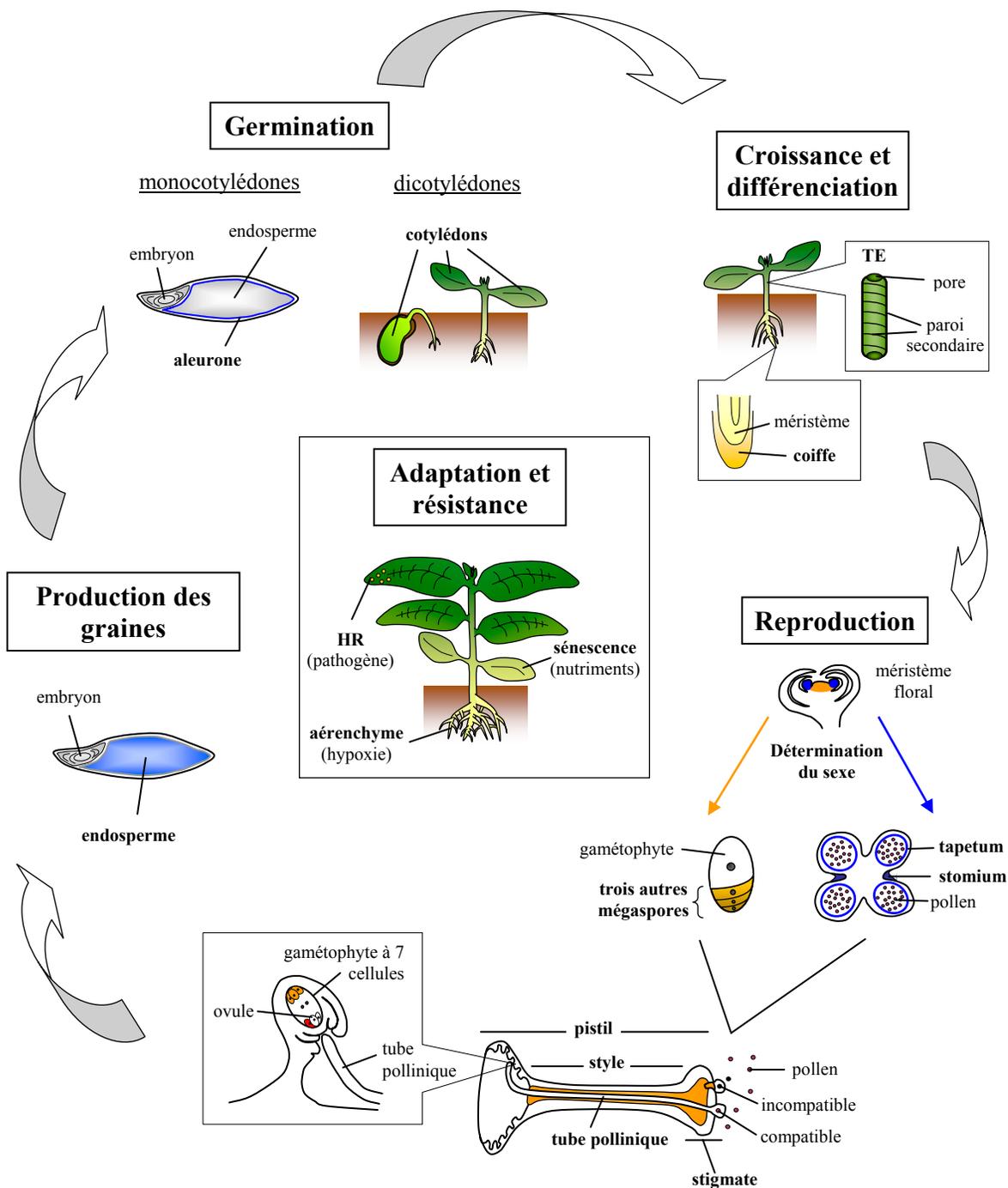
## 1.4 La PCD chez les végétaux

La PCD fait partie intégrante du mode de vie des végétaux et est ainsi essentielle au développement et à la survie au même titre que chez les mammifères, que ce soit au cours du développement normal ou pour faire face à des stress biotiques et abiotiques (Jones, 2001). L'effervescence dans ce domaine de recherche chez les animaux a lentement mais sûrement gagné l'intérêt des biologistes végétaux, de sorte que la PCD végétale reçoit maintenant l'intérêt qu'elle mérite. Cela n'a évidemment rien à voir avec la « ruée vers l'or » dont la PCD animale a été et est toujours l'objet, mais la PCD végétale constitue maintenant un champs de recherche de la biologie végétale. Au-delà de certaines visées nobles que sont l'élargissement des connaissances amenées par des recherches fondamentales (en particulier concernant l'évolution de la PCD chez les eucaryotes), cette recherche vise en particulier à améliorer notre capacité de réguler la mort chez les végétaux pour des applications en agriculture et dans l'industrie post-récolte (Lam *et al.*, 1999).

La section 1.4.1 présentera un survol de l'implication de la PCD dans la vie d'une plante, puis la section suivante (1.4.2) sera consacrée à la transduction de signal impliquée dans la PCD végétale. Finalement, la section 1.4.3 abordera brièvement la question de l'existence de caspases végétales avant de nous tourner vers les régulateurs potentiels de la PCD chez les plantes (section 1.4.4).

### **1.4.1 Survol : PCD développementale et adaptative**

Chez les angiospermes, la PCD est essentielle à pratiquement toutes les étapes du développement, de la germination de la graine jusqu'à l'obtention d'une plante mature, sa fertilisation puis la formation et la maturation de graines par cette plante. Les différentes étapes du développement ayant recours à la PCD sont résumées à la Figure 1-6, alors que la Figure 1-7 présente les structures macroscopiques typiques des angiospermes afin de permettre au lecteur de s'y familiariser si nécessaire.

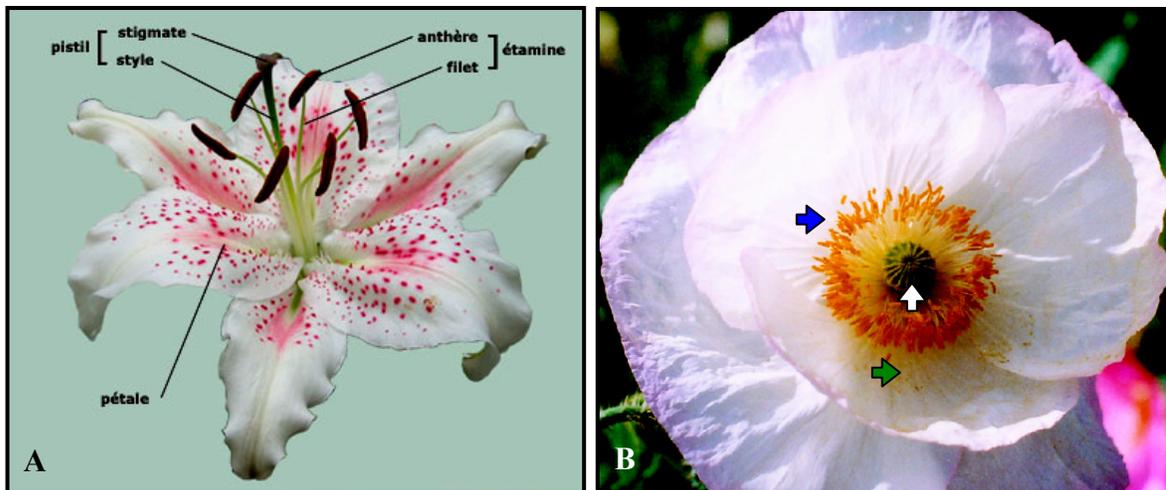


**Figure 1-6 : Un aperçu de la PCD dans la vie des angiospermes.**

Les structures où se produit la PCD sont parfois illustrées en bleu, sauf dans la PCD associée à la reproduction sexuelle, où le bleu est associé aux structures mâles, et l'orange et le rouge aux structures femelles. Lors de la germination, l'aleurone (en bleu) ou les cotylédons fournissent l'énergie nécessaire au développement de l'embryon. Les TEs (*tracheary elements* 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 ou en voie de l'être. Le méristème apical floral peut donner naissance aux primordia des étamines (mâles, région bleue) et du carpelle (femelle, zone orange). Chez la femelle (flèche orange), une mégaspore haploïde formera le gamétophyte alors que les trois autres meurent. Dans les anthères (mâle, flèche bleue), le tapetum dégénère pour compléter la formation du pollen et la mort du stomium en permet la dispersion. Au cours de la pollinisation, l'arrivée sur le pistil d'un pollen incompatible provoque la mort du tube pollinique. Au contraire, un pollen compatible entraîne la croissance du tube pollinique, dont le passage est facilité par la mort du tissu avoisinant (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 (réponse hypersensible; HR) ou s'adapter au manque de nutriments ou d'oxygène. Consulter le texte pour d'autres détails. Tiré de Ouellet (2004) .

### 1.4.1.1 Détermination du sexe

La plupart des angiospermes sont hermaphrodites, c'est-à-dire qu'elles produisent des fleurs portant à la fois les organes de reproduction mâles et femelles. Cependant, environ 10% sont plutôt unisexuées, c'est-à-dire porteuses des éléments mâles et femelles sur des fleurs différentes, et ce soit sur des plantes différentes (monoïques) ou sur la même plante (dioïques; revu par Wu et Cheung, 2000). Parmi les plantes monoïques bien connues figurent celles du genre *Cannabis*, alors que le maïs (*Zea mays*) constitue une plante dioïque chez laquelle les structures mâles sont situées à l'extrémité supérieure de la plante, tandis que les structures femelles sont réparties le long de la tige. Le concombre (*Cucumis sativus*) est un autre exemple agronomique répandu de plante dioïque. Or, chez certaines plantes comme le maïs, tous les méristèmes floraux produisent des primordia pour les structures des deux sexes, mais l'unisexualité survient par son élimination subséquente ou l'inhibition de sa différenciation. Dans les deux cas, l'avortement du primordium est précédé d'une vacuolisation de la cellule et de la perte de l'intégrité des organelles et du cytoplasme, suggérant une PCD de type autophagie (Cheng *et al.*, 1983). De plus, certaines phytohormones comme le GA, les brassinostéroïdes (Wu et Cheung, 2000) ou même les cytokinines (Young *et al.*, 2004a) pourraient être impliquées dans le processus (voir la revue de Khryanin, 2002). Tout comme plusieurs autres modèles de PCD végétale, celle-ci se trouve sous contrôle génétique (revu par Tanurdzic et Banks, 2004). Par exemple, le gène *TS1* semble conférer au pistil une protection contre l'avortement dans l'inflorescence femelle, possiblement en interférant avec le gène *TS2*, dont l'activité dans les cellules du pistil est nécessaire à son avortement (Calderon-Urrea et Dellaporta, 1999).



**Figure 1-7 : La fleur chez les angiospermes.**

**A)** Structures florales principales telles que présentes chez le lys. Le pistil inclut également l’ovaire, qui est situé à sa base (non visible sur la photo) et qui contient les sacs embryonnaires. Le pistil est constitué des structures de reproduction femelles, alors que les étamines sont le pendant mâle, porteuses du pollen au niveau des anthères. Tiré du site web « <http://www.aujardin.info/fiches/structure-fleur.php> ». **B)** *Papaver rhoeas*. Les structures jaunes et orange (flèche bleue) sont les filets et anthères qui constituent les abondantes étamines typiques des pavots. Les traces jaunes sur les pétales (flèche verte) sont des grains de pollen tombés des anthères, alors que d’autres tentent leur chance sur le stigmate du pistil (la portion brune-noire au centre de la fleur, flèche blanche. Tiré de McClure (2004).

#### 1.4.1.2 Formation du pollen

Dans les anthères (les structures de reproduction mâles, Figure 1-7), la production de grains de pollen fonctionnels et leur dispersion reposent sur la PCD du tapetum et du stomium, respectivement (revu par Wu et Cheung, 2000). Le tapetum est une assise (monocouche) de cellules entourant le tissu sporogène (i.e. les sacs polliniques), qui exerce une fonction nutritive pour le développement et la maturation des grains de pollen. À un stade spécifique de la maturation, les cellules du tapetum dégèrent et meurent (voir la fin du paragraphe), contribuant ainsi à compléter la maturation du pollen en lui fournissant certaines molécules extracellulaires de nature protéique et lipidique importantes pour les interactions entre le pollen et le pistil au cours de la pollinisation. D’un point de vue morphologique, la dégénération du tapetum est associée entre autres à une forte vacuolisation du cytoplasme

et à sa rétraction ainsi qu'à l'amincissement de la paroi cellulaire déjà peu développée, permettant la rupture éventuelle de ces cellules au profit du pollen (Bedinger, 1992).

D'autre part, l'ouverture du stomium est essentielle pour la dispersion du pollen. Le stomium consiste en une structure spécialisée se retrouvant en continuum avec l'épiderme, positionnée latéralement de chaque côté de l'anthere (voir Figure 1-6). La PCD au niveau des cellules du stomium permet la rupture de l'anthere et conséquemment l'ouverture des sacs polliniques, une étape indispensable pour le relâchement du pollen (revu par Wu et Cheung, 2000).

### **1.4.1.3 Formation de l'ovule et fertilisation**

L'organe femelle de la plante doit également avoir recours à la PCD en de nombreuses occasions pendant son existence. Ainsi, la formation du gamétophyte, ou sac embryonnaire, débute typiquement au sein de l'ovaire par une mégaspore diploïde qui, suite à la méiose, donne naissance à quatre mégaspores haploïdes, dont trois meurent par PCD (Figure 1-6). La mégaspore restante entreprend ensuite trois rondes de mitose, accompagnées de fusion et migration nucléaire produisant le sac embryonnaire typique à sept cellules et huit noyaux (gamétophyte). Certaines de ces cellules, appelées synergides, sont positionnées de façon à bloquer l'entrée (micropyle) du sac embryonnaire, et l'une d'entre elles meure éventuellement par PCD pour permettre le passage du tube pollinique. D'autre part, à l'opposé du micropyle se trouvent les cellules antipodales, qui dégènèrent également après la fertilisation (revu par Wu et Cheung, 2000).

La fertilisation en question implique évidemment la rencontre d'un grain de pollen et de l'ovule. Or, ce dernier est bien encastré dans le sac embryonnaire, à la base du pistil (structure de reproduction femelle), alors que le réceptacle attiré du pollen est le stigmate, localisé à l'autre extrémité du pistil, les deux étant connectés par le style (Figures 1-6 et 1-7). Suivant la rencontre du grain de pollen et du stigmate, le pollen germe de façon à produire un tube pollinique qui pénètre le tissu stigmatique puis s'allonge à travers la matrice extracellulaire du style, dans un tissu particulier au centre du style appelé tissu de

transmission. Le tube pollinique atteint éventuellement l'ovaire, puis l'entrée du sac embryonnaire où une cellule (synergide) se sacrifie pour le laisser entrer (voir ci-haut).

La croissance du tube pollinique s'accompagne de dégénération cellulaire dans le tissu de transmission (revu par Cheung, 1996; Wu et Cheung, 2000). En effet, les cellules de ce dernier deviennent très désorganisées et se remplissent d'une large vacuole, sans aucune présence visible de cytoplasme. D'autres cellules présentant un cytoplasme sont toutefois très déformées (Cheung, 1996; Wang *et al.*, 1996b) Cette désorganisation massive semble spécifique aux cellules du tissu de transmission, puisque les cellules avoisinantes du tissu cortical demeurent intactes. Elle génère suffisamment d'espace pour le passage du tube pollinique dans l'espace intercellulaire, qui se remplit également de matériel cytosolique relargué des cellules du tissu de transmission en dégénérescence. Ce matériel fournit un environnement accueillant pour le passage du tube pollinique, qui y retrouve un milieu physiquement propice mais aussi biochimiquement attrayant grâce à des facteurs de croissance et d'attraction (adhésion) qui lui permettent de se développer adéquatement jusqu'à l'ovaire et le sac embryonnaire (Cheung, 1996; Wang *et al.*, 1996b; Lord, 2000). En fait, ces facteurs semblent importants pour assurer l'élongation pollinique vers la bonne direction, ce qui ne peut être obtenue par culture *in vitro* (Cheung, 1996). Le sacrifice des cellules du tissu de transmission pourrait donc fournir les nutriments, le support mécanique et les indications directionnelles nécessaires à la croissance du tube pollinique. Il a également été suggéré que la mort de ces cellules empêche l'invasion de l'ovaire par des pathogènes (Wu et Cheung, 2000). Ce type de mort est hors de tout doute programmé puisque développemental, bien qu'aucune des caractéristiques typiques de la PCD n'aient été rapportées dans la littérature.

Il arrive souvent qu'un grain de pollen de l'anthère tombe sur le stigmate de la même fleur, et dépendamment des espèces, il existe un mécanisme qui permet de reconnaître le grain comme étant incompatible et ainsi empêche son développement jusqu'à l'ovaire. Il s'agit d'une réponse dite d'auto-incompatibilité (*self-incompatibility*, SI), l'un des plus importants mécanismes de prévention de l'auto-croisement (*inbreeding*). La SI est contrôlée par un unique locus S multiallélique extrêmement polymorphique, portant des gènes de spécificité, l'un exprimé sur le pollen et l'autre sur le pistil, permettant au pistil de reconnaître le soi du

non-soi, et de rejeter le soi en favorisant la mort du grain de pollen en germination (Rudd et Franklin-Tong, 2003; Kao et Tsukamoto, 2004). Certains résultats suggèrent que cette mort relève de la PCD, entre autres parce qu'elle implique la fragmentation de l'ADN nucléaire chez le pavot *Papaver rhoeas* (Jordan *et al.*, 2000). Cependant, comme la fragmentation a été détectée *via* une méthode de marquage *in situ*, il n'a pas été possible de déterminer si la dégradation était internucléosomale. Quoi qu'il en soit, d'autres caractéristiques typiques de la PCD ont été observées pour le même système, soit la sortie du *cytc* des mitochondries et des activités *caspase-like* (caractéristiques qui seront abordées plus en détails à la section 1.4.3), démontrant des ressemblances étonnantes avec la PCD de type HR (Thomas et Franklin-Tong, 2004).

#### **1.4.1.4 Formation de la graine et germination**

##### **1.4.1.4.1 Généralités**

Les angiospermes sont divisées en deux catégories, soit les monocotylédones et les dicotylédones (Raven *et al.*, 1999). Comme leur nom l'indique, ces plantes, ou plutôt l'embryon contenu dans la graine, sont pourvues respectivement d'un seul ou de deux cotylédons. Les cotylédons représentent donc les feuilles de l'embryon. Chez les dicotylédones, ces deux feuilles constituent les réserves énergétiques de la jeune plantule, qui les utilisera pour assurer les premiers stades de son développement, en attendant la formation des premières « vraies feuilles » qui leur permettront, *via* la photosynthèse, d'être autonomes quant à leur source de carbone. L'intérieur de la graine est donc majoritairement rempli par les cotylédons.

Cependant, chez les monocotylédones, la feuille ne dispose que de peu de réserves, celles-ci étant majoritairement localisées dans l'endosperme. Celui-ci est constitué principalement de l'endosperme amylicé, très riche en amidon, et minoritairement d'une mince couche de cellules spécialisées appelée aleurone. La PCD fait partie intégrante du développement de ces deux types de tissus, bien que leur mort soit temporellement distinctes. Ainsi, au cours du processus de formation de la graine, l'endosperme amylicé meurt après que le grain ait terminé son emmagasinement énergétique (*grain filling*). Au contraire, les cellules de la

couche de l'aleurone qui entoure l'endosperme demeurent bien vivantes dans la graine mature, et ce jusqu'à quelques jours après la germination. Voyons avec un peu plus de détails ces processus qui ont été relativement bien caractérisés chez les céréales telles que le maïs et le blé, en particulier dans les cellules de l'aleurone (voir les revues de Fath *et al.*, 2000; Young et Gallie, 2000).

#### **1.4.1.4.2 Endosperme amylicé et embryogénèse**

La fonction de l'endosperme est de fournir l'embryon en nutriments au cours de la germination. Au cours du processus de maturation de la graine, la division cellulaire est d'abord très active, puis cesse pour faire place surtout à la synthèse protéique, lipidique et amylicée. La phase terminale de la maturation implique l'arrêt des processus biosynthétiques, l'induction de la dessiccation et finalement la dormance. De façon coordonnée avec le début de la phase terminale, la PCD est induite progressivement jusqu'à absorber tout le tissu, ne laissant que la couche de l'aleurone intacte. Il est intéressant de mentionner que chez le maïs, l'orchestration temporelle de la mort semble être en fonction de l'âge développemental des cellules, les premières cellules à mourir étant les plus vieilles, et les dernières étant celles adjacentes à la couche de l'aleurone, donc les plus jeunes. Il est évident que la régulation du programme de mort doit être très stricte, car une induction prématurée pourrait limiter la déposition de réserve et donc compromettre la germination, tel que révélé par l'existence de nombreux mutants (revu par Young et Gallie, 2000).

La régulation de la PCD dans l'endosperme est sous l'emprise de l'éthylène, une phytohormone très sollicitée par différentes formes de PCD végétales. En effet, la production d'éthylène se présente en deux phases au cours de la formation de la graine; la deuxième phase coïncide avec une augmentation d'activités nucléases et la détection de la fragmentation internucléosomale de l'ADN nucléaire, qui surviennent vers la fin de la phase terminale. L'application exogène d'éthylène au cours du développement de la graine contribue également à accélérer l'induction et l'intensité de la PCD, qui est alors accompagnée d'une fragmentation de l'ADN encore plus prononcée. Au contraire, l'application d'inhibiteurs de la synthèse de l'éthylène ou de sa perception réduit la mort cellulaire et la fragmentation de l'ADN. Des mutants ont révélé l'importance de l'éthylène

ou de d'autres facteurs qui affectent la production ou la perception de l'éthylène dans la régulation de la PCD (voir entre autres Gallie et Young, 2004). En outre, une autre phytohormone, l'acide abscissique (ABA), régule négativement la production d'éthylène (revu par Young et Gallie, 2000).

Outre la dégénérescence des cellules constituant l'endosperme, la formation de l'embryon nécessite elle aussi de la PCD pour mener à terme le développement des graines. Par exemple, les cellules du suspenseur supportent les premières étapes du développement embryonnaire en fournissant nutriments et régulateurs de croissance. Le suspenseur agit véritablement en tant que conduit pour le transport des nutriments et aide l'embryon dans l'établissement et le maintien de sa polarité (tige *vs* racine) (revu par Jones et Dangl, 1996; Buckner *et al.*, 1998). Lorsque l'embryon atteint le « stade cœur », le suspenseur n'est plus nécessaire et dégénère par PCD, dont la description morphologique rappelle étrangement l'autophagie (Jones et Dangl, 1996). Il est d'ailleurs fort probable que la dégénérescence du suspenseur ait effectivement recours à l'autophagie, puisqu'il semble que ces cellules développent des organelles spécialisées contenant des activités hydrolytiques, et ce bien avant les premiers signes de dégénérescence (Jones et Dangl, 1996). Cependant, ce n'est que récemment que la fragmentation de l'ADN des cellules du suspenseur a été rapportée, de même que celle de d'autres structures temporaires de l'embryon (Giuliani *et al.*, 2002).

#### 1.4.1.4.3 Aleurone

Comme nous l'avons souligné plus haut (1.4.1.4.1), les cellules de la couche de l'aleurone sont bien vivantes dans la graine mature, car elles ont un rôle actif à jouer au cours de la germination. En effet, ces cellules synthétisent et sécrètent des enzymes hydrolytiques qui dégradent les réserves de l'endosperme amylacé au profit de l'embryon en développement. À la fin de leur mandat, ces cellules exécutent un programme de mort pouvant être décrit comme de l'autodigestion, afin de contribuer une dernière fois à la croissance de l'embryon *via* le sacrifice de leurs propres constituants (revu par Fath *et al.*, 2000; Fath *et al.*, 2001). Chez la plupart des céréales, la couche de l'aleurone entoure l'endosperme et n'est constituée que d'une seule assise de cellules, dont le cytoplasme est constitué principalement de vacuoles d'entreposage des protéines (*protein storage vacuoles*; PSV).

Ces vacuoles, qui sont dérivées du RE, constituent un entrepôt pour les réserves en acides aminés nécessaires à la synthèse des enzymes hydrolytiques, mais aussi des hydrates de carbones non amylacés ainsi que des minéraux.

Comme dans le cas de l'endosperme amylacé, le sort des cellules de l'aleurone dépend de l'action de phytohormones, soit l'acide gibbérellique (GA) et l'ABA. Suite à l'initiation de la germination par l'imbibition (absorption d'eau), l'embryon produit le GA, qui stimule les cellules de l'aleurone à synthétiser des hydrolases (surtout des  $\alpha$ -amylases) et à les sécréter vers l'endosperme amylacé. Toutes ces enzymes sont synthétisées *de novo* suite à l'hydrolyse des protéines de réserve des PSV, qui fusionnent et éventuellement forment une seule grande vacuole hydrolytique. Certaines des enzymes synthétisées sont donc confinées aux PSV devenues, sous l'action du GA, des organelles hydrolytiques. Au bout d'un certain temps, la sécrétion des hydrolases cesse, coïncidant avec les premières observations de cellules mortes. Au contraire, l'ABA agit en tant qu'antagoniste du GA et ainsi prévient la synthèse d'hydrolases et la PCD (Fath *et al.*, 2001).

La morphologie associée à la PCD des cellules de l'aleurone ressemble à celle retrouvée dans le cas de l'autophagie, soit le confinement du cytoplasme à une zone étroite entre la membrane plasmique et la vacuole. Les autres organelles, réduites en nombre, s'accumulent autour du noyau. La mort en tant que telle semble aléatoire, survenant brusquement suite à la perte de l'intégrité de la membrane plasmique, qui est rapidement suivie du rétrécissement du corps cellulaire (Fath *et al.*, 2001). Les données concernant la dégradation de l'ADN indiquent qu'il serait bel et bien dégradé, mais l'échelle apoptotique représentative de la dégradation internucléosomale n'aurait pas été détectée (Bethke *et al.*, 1999; Fath *et al.*, 1999; Fath *et al.*, 2001).

Bien que les cellules de l'aleurone puissent sembler mourir dû à l'épuisement des ressources de la cellule survenant suite à une intense production d'hydrolases, différentes expérimentations mettant en vedette l'ABA ont permis de découpler la mort de la synthèse d'enzymes. En effet, non seulement l'ABA retarde dramatiquement la PCD des cellules de l'aleurone non stimulées par le GA, mais elle peut également retarder la mort de cellules

pré-stimulées, bien que la synthèse d'hydrolases ne soit pas inhibée (Fath *et al.*, 2000; Fath *et al.*, 2001). De nombreux indices suggèrent que les ROS (dont il sera question à la section 1.4.2.1) seraient les grands responsables de l'exécution de la PCD. Ainsi, les cellules incubées dans le GA sont plus sensibles à l'induction de la PCD par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que celles incubées dans l'ABA (Bethke et Jones, 2001; Fath *et al.*, 2001). Cette sensibilité serait possiblement due à une faible expression des enzymes métabolisant les ROS, telles que la catalase, l'ascorbate peroxidase et la superoxide dismutase, qui sont au contraire fortement exprimées dans les cellules de l'aleurone incubées dans l'ABA (Fath *et al.*, 2002).

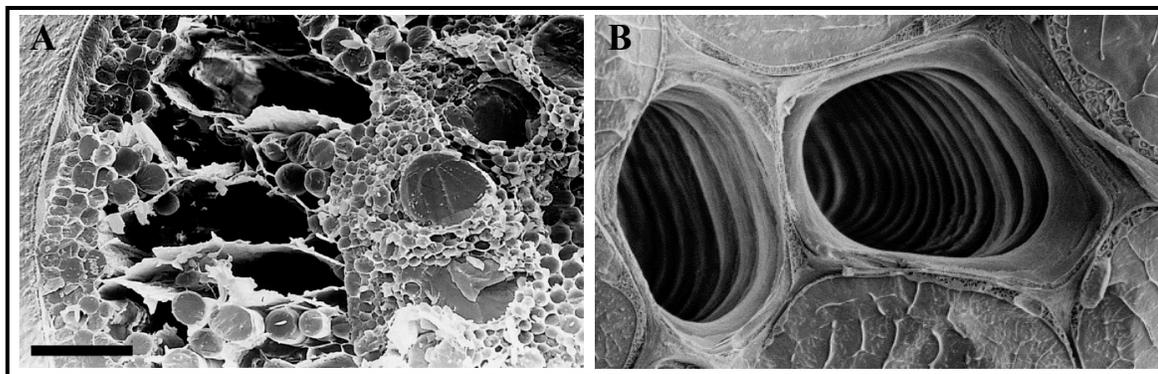
#### **1.4.1.5 La racine : développement et adaptation à la croisée des chemins**

La racine en croissance doit parfois faire face à des conditions environnementales qui n'ont rien à voir avec les géloses douces et humides de nos laboratoires. La nature faisant bien les choses, elle a pourvu le système racinaire de structures de protection et de mécanismes d'adaptation qui lui sont propres. À l'extrémité apicale de la racine, la coiffe qui la recouvre est en quelque sorte une gaine cellulaire lui assurant protection et souplesse. En effet, les cellules de la coiffe sont constamment produites par le méristème apical, de sorte qu'elles sont continuellement déplacées en périphérie, où elles finissent par mourir et se désintégrer suite à l'abrasion par le sol. Le contenu cellulaire ainsi libéré dans l'environnement de la coiffe contribue à enrichir le mucilage recouvrant l'extrémité de la racine. Ce mucilage contribue à diminuer la friction entre la racine et le sol (Buckner *et al.*, 1998; Raven *et al.*, 1999).

Les racines qui se développent dans l'eau présentent aussi de la mortalité, de sorte que l'on ne peut pas argumenter que les cellules de la coiffe meurent dû à la friction pendant la pénétration dans le sol (Pennell et Lamb, 1997). Les cellules en périphérie de la coiffe sont hautement vacuolisées, présentant des signes d'autophagie (observations personnelles), et l'on observe également de la fragmentation de l'ADN nucléaire par des méthodes de marquage *in situ* (TUNEL) dans la coiffe de racines d'oignon (Wang *et al.*, 1996a) et de maïs (L. Brisson *et al.*, résultats non publiés). L'ensemble de ces observations porte à croire que les cellules de la coiffe meurent par PCD.

Les racines peuvent également activer la PCD dans certaines de leurs cellules lorsqu'elles se trouvent en hypoxie, comme par exemple lorsque le sol est très compact, se retrouvant alors dans l'incapacité de se procurer dans leur environnement immédiat l'oxygène dont elles ont besoin. Ce phénomène est la formation de l'aérenchyme, générant un tissu poreux (voir Figure 1-8) dont la fonction est de faciliter le transport de l'oxygène de la tige vers les cellules des racines, mais aussi de réduire le nombre de cellules consommant le précieux gaz. Ce phénomène est très courant chez les plantes exposées à des inondations fréquentes et il est constitutif chez certaines comme le riz, dont les racines sont toujours en hypoxie (Drew *et al.*, 2000).

L'hypoxie stimule la synthèse de la phytohormone éthylène et certains gènes de la famille des ACC synthétases (enzymes impliquées dans la synthèse de l'éthylène) sont spécifiquement induits par une déficience en oxygène. Des inhibiteurs de l'action ou de la synthèse de l'éthylène bloquent la formation de l'aérenchyme en hypoxie. De plus, la formation de l'aérenchyme peut être induite en milieu bien oxygéné par une privation transitoire en azote ou en phosphore. Ce processus est aussi dépendant de l'éthylène, mais ne requiert pas d'augmentation de la production mais plutôt une augmentation de la sensibilité envers l'éthylène. Toutes ces données pointent en faveur de l'éthylène comme inducteur de la PCD dans la formation de l'aérenchyme, qui passerait par une transduction de signal impliquant les protéines G, une modulation du  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  et des protéines phosphatases (revu par Drew *et al.*, 2000). De plus, la rupture de la vacuole serait un événement précoce dans ce type de PCD (Campbell et Drew, 1983), rappelant le cas des tissus vasculaires (voir section suivante).



**Figure 1-8** : Micrographies électroniques à balayage présentant un exemple d'aérenchyme et de *tracheary element* (TE).

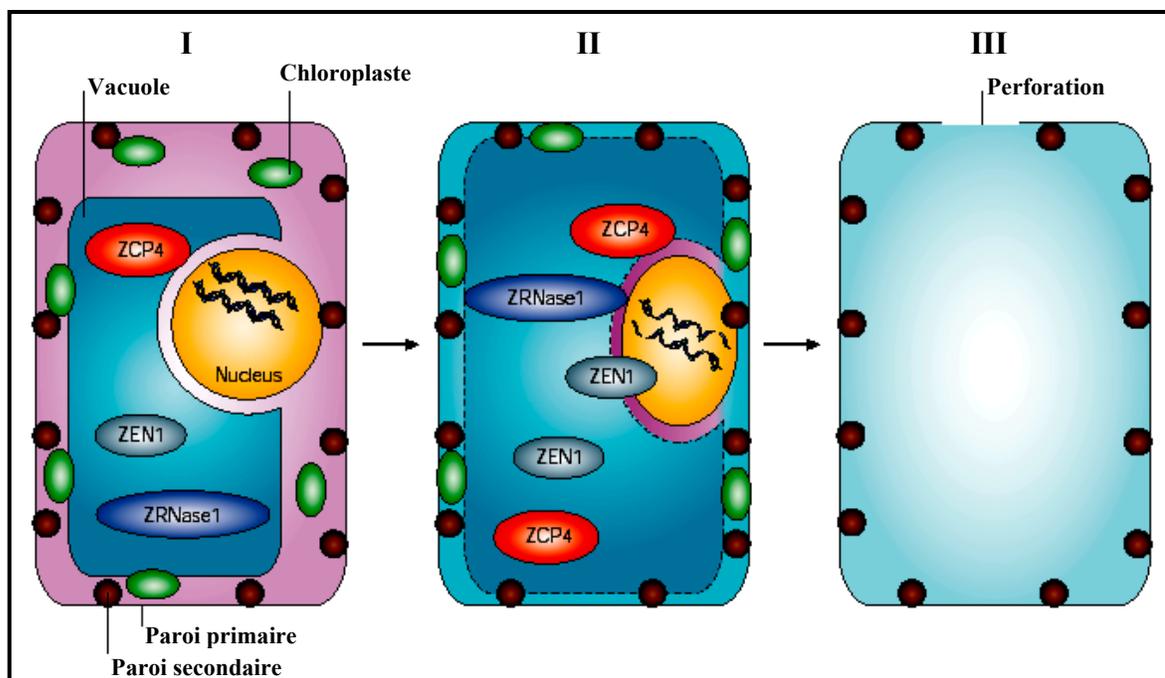
**A)** Dans les racines de maïs en hypoxie, certaines cellules meurent pour former l'aérenchyme, des cavités (grandes zones noires) facilitant l'apport d'oxygène aux cellules restantes. La barre vaut 0,1 mm (tiré de Drew *et al.*, 2000). **B)** Les éléments conducteurs (TE) du xylème sont en fait des cellules mortes dont la paroi secondaire est renforcie. Il s'agit ici de la tige chez *Zinnia* (tiré de Roberts et McCann, 2000).

#### 1.4.1.6 Formation des tissus vasculaires

La xylogénèse (formation du xylème) représente l'une des formes les plus dramatiques de la PCD végétale, mais figure aussi parmi les mieux caractérisées. Le xylème est un tissu complexe servant au transport de l'eau et des minéraux à travers la plante. Il est constitué essentiellement de cellules mortes (voir Figure 1-8) associées bout à bout de façon à former de longs tuyaux vides. Ces cellules peuvent être des trachéides ou des éléments de vaisseau et sont regroupées sous l'appellation générale de vaisseaux ou éléments conducteurs, mais nous utiliserons l'appellation anglaise *tracheary elements* (TE) pour plus de commodité. Les cellules destinées à former les futurs TE entreprennent une différenciation dépendant entre autres de plusieurs phytohormones (auxines, cytokinines et brassinostéroïdes) et au cours de laquelle elles synthétisent une paroi secondaire qui assurera la rigidité nécessaire pour supporter la très forte pression que l'on retrouve dans ces conduits. La dernière étape du processus de différenciation est la PCD, qui permet l'élimination du contenu cellulaire. La PCD dans les TE semble intimement reliée à la formation de la paroi secondaire, puisque jusqu'à présent, aucun agent ou mutation n'a permis d'inhiber la PCD sans affecter la formation de cette paroi, et *vice versa* (voir les revues de Fukuda, 2000, 2004). Cette

forme de PCD est spéciale et semble à peu près unique chez les végétaux et la forme qui semble le plus s'en rapprocher est la formation de l'aérenchyme (section 1.4.1.5), abstraction faite de la formation de la paroi secondaire.

L'étude de ce type de PCD a beaucoup profité du développement d'un modèle *in vitro* permettant la transdifférenciation en TE à partir de cellules isolées du mésophyle foliaire, et ce sans division cellulaire (Fukuda et Komamine, 1980b, a). Tel que présenté à la Figure 1-9, le processus de différenciation entraîne la synthèse et l'accumulation dans la vacuole d'enzymes hydrolytiques dont les activités sont optimales en conditions acides. Notons des cystéine et sérine protéases, des RNases, des nucléases (*S1-type*, exprimées spécifiquement dans cette forme de PCD), des phosphatases acides et des lipases (Demura *et al.*, 2002; Fukuda, 2004). La vacuole prend alors de l'expansion et se transforme en compartiment à activité lytique très élevée, un peu comme le sont les lysosomes animaux. L'autolyse dans les TE, qui débute par la rupture de la vacuole, est extrêmement rapide; la dégradation de l'ADN nucléaire et chloroplastique est complétée en moins de 15 minutes et l'ensemble de la digestion est terminée en moins de 6 h (Obara *et al.*, 2001; Fukuda, 2004). Un fait intéressant à souligner est l'ordre dans lequel les organites sont dégradés. En effet, tel que mentionné précédemment, la vacuole est le premier organite à montrer des signes de dégénération, puis les organites à membrane simple (RE et Golgi) gonflent avant de disparaître. Peu de temps après vient le tour des organites à double membrane, la dégénération commençant par leur matrice avant d'atteindre les membranes (Groover et Jones, 1997).



**Figure 1-9 :** La PCD pendant la différenciation des *tracheary elements* (TE).

Dans les TEs en formation, des enzymes hydrolytiques spécifiquement exprimées pendant la PCD (telles que la S1-nucléase *ZEN1*, la RNase *ZRNase1* et la cystéine protéase *ZCP4*) s'accumulent dans la vacuole (I). Celle-ci prend de l'expansion jusqu'à ce qu'elle éclate et les enzymes ainsi libérées procèdent à l'autolyse du contenu cytoplasmique (II). Finalement, la perforation de la paroi mène à la perte du contenu cellulaire, ne laissant que la paroi renforcie (III). Tiré de Fukuda (2004).

#### 1.4.1.7 Sénescence

La sénescence est probablement l'une des manifestations les plus évidentes de la PCD végétale. Par exemple, après la pollinisation, les pétales ne sont plus nécessaires et entament rapidement un programme de sénescence (Rubinstein, 2000). Ce phénomène peut être particulièrement drastique chez les monocotylédones de la famille des orchidées, comme par exemple chez les représentants du genre *Phalaenopsis*, qui sont très populaires entre autres dû au fait que leurs fleurs peuvent vivre jusqu'à trois mois. Or, leurs pétales commencent à mourir moins d'un jour après la pollinisation. De son côté, la sénescence foliaire se remarque assez facilement par le jaunissement des feuilles, le plus souvent les plus vieilles à la base de la plante. Certaines plantes, surtout des annuelles comme par

exemple les plantes fourragères, sénescent entièrement à la fin de leur cycle de vie, consacrant toute leur énergie à la production de leurs graines (Noodén *et al.*, 1997). La sénescence est donc une forme de PCD particulière puisque le recyclage des nutriments y est un facteur fondamental. De plus, elle n'affecte pas seulement un petit groupe de cellules mais plutôt un organe complet (et dans certains cas l'organisme entier à l'exception des graines). Cette PCD permet non seulement le recyclage des nutriments mais également l'élimination d'un organe puits (voir paragraphe suivant), de sorte que l'on peut considérer que la plante fait des économies énergétiques tout en récupérant des matériaux de construction. Il est à noter que certains auteurs ont établi une distinction entre les étapes de recyclage et la mort en tant que tel (voir le commentaire de van Doorn et Woltering, 2004). Ainsi, sous prétexte que les premières phases sont réversibles, elles se sont vues associées à la sénescence et le terme PCD a été confiné aux dernières étapes, à partir du point de non-retour. Or, dans la nature, il est plutôt rare que le processus retourne en arrière et la décision d'en arriver ultimement à la PCD a été prise bien avant que ne commence le processus de mobilisation des nutriments (les premières étapes réversibles). Nous préférons donc, en accord avec van Doorn et Woltering (2004), associer la PCD à l'ensemble du processus de sénescence, et ce tout au long de cet ouvrage.

Les feuilles sont des organes spécialisés dans la photosynthèse et la plante investit beaucoup d'énergie et de nutriments dans leur production initiale (Quirino *et al.*, 2000). Les feuilles peuvent même être considérées comme une forme d'entreposage de l'azote, disponible en quantité limitée dans le sol, en vue des besoins futurs (Chandlee, 2001). Après une période de productivité où la feuille est une source d'énergie, sa contribution en photosynthétats diminue éventuellement, jusqu'au point où la feuille devient plutôt un puits, ne produisant même plus assez d'énergie pour se suffire à elle-même (la relation source-puits entre les différents organes de la plante est un concept fondamental en physiologie végétale; voir Raven *et al.*, 1999). Elle entreprend alors la dernière étape de son développement, la sénescence. Au cours de ce lent processus de démantèlement, les nutriments comme l'azote, le phosphore et différents minéraux qui avaient été initialement investis dans la feuille sont recyclés vers d'autres organes en développement, tels que les jeunes feuilles, les fleurs, les graines en développement, ou sont entreposés dans des rhizomes ou tubercules en vue de la prochaine saison de croissance (Quirino *et al.*, 2000).

Au niveau macroscopique, la sénescence est caractérisée par le jaunissement (résultant de la perte de la chlorophylle) qui culmine avec le dessèchement complet et souvent l'abscission de la feuille. Au niveau cellulaire, le démantèlement est exécuté dans un ordre très précis (Butler et Simon, 1971). Les chloroplastes sont les premières cibles, ce qui n'est pas étonnant considérant que la majeure partie des protéines foliaires y est accumulée et que ces organelles ne sont plus nécessaires au fonctionnement cellulaire. Le noyau, requis pour la transcription des gènes nécessaires à l'exécution de la sénescence (par exemple des protéases, des RNases et des glutamine synthétases), et les mitochondries, essentielles pour la production de l'énergie requise au processus, sont naturellement les derniers éléments affectés (voir les revues de Butler et Simon, 1971; Quirino *et al.*, 2000; Yoshida, 2003). Les données relatives à la dégradation de l'ADN pendant la sénescence sont peu nombreuses et contradictoires, une étude rapportant de la dégradation au niveau internucléosomal (Yen et Yang, 1998) et l'autre pas (Lee et Chen, 2002). Des études de la sénescence florale ont toutefois rapporté l'occurrence de la fragmentation de l'ADN (Orzaez et Granell, 1997; Rubinstein, 2000; Yamada *et al.*, 2003). La sénescence peut également être observée dans des cultures *in vitro* de cellules végétales lorsqu'elles atteignent la phase stationnaire. Ainsi, la sénescence peut être induite autant *in vitro* que chez des plantes entières par une carence en nutriments (comme l'azote ou le carbone; voir Aubert *et al.*, 1996; Moriyasu et Ohsumi, 1996).

La vacuolisation du cytoplasme est immanquable dans ce processus, qui relève définitivement de l'autophagie (Butler et Simon, 1971; Lee et Chen, 2002). D'ailleurs, l'autophagie chez les végétaux relève des gènes *ATG*, conservés entre les plantes, les animaux et la levure (Yoshimoto *et al.*, 2004). L'analyse phénotypique de mutants d'*Arabidopsis* chez lesquels un gène *ATG* est inactivé par l'insertion d'un T-DNA a révélé que l'autophagie est requise pour l'établissement de la sénescence et un recyclage efficace des nutriments, mis en évidence entre autres par une sénescence plus rapide accompagnée d'une plus faible production de graines, particulièrement lorsque les nutriments se font rares (Hanaoka *et al.*, 2002; Doelling *et al.*, 2002). Il est probable que l'autophagie, par le recyclage des nutriments qu'elle confère, aide à la survie en conditions de disette.

L'initiation et la progression de la sénescence peuvent donc être influencées par différents facteurs externes et internes. Les facteurs internes concernent essentiellement la balance hormonale. Il est bien connu que le niveau de cytokinines diminue pendant la sénescence, et une application exogène peut la retarder (Mok, 1994; Raven *et al.*, 1999). Au contraire, l'éthylène favorise la sénescence et l'application d'inhibiteurs de la synthèse de l'éthylène la retarde (Chandlee, 2001; Young *et al.*, 2004b). En fait, il semblerait que la majorité des phytohormones puissent jouer un rôle dans la sénescence, y compris l'acide jasmonique (AJ) et l'ABA, mais ces rôles n'ont pas été clairement définis. Par exemple, des mutants ayant une déficience dans le sentier de signalisation de l'acide salicylique (AS) ne semblent pas exécuter le processus de mort aussi efficacement que les plantes sauvages, leurs feuilles demeurant jaunes sans devenir nécrotiques (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003). Parmi les facteurs externes pouvant affecter la sénescence, notons la température, l'humidité, les infections microbiennes, l'intensité lumineuse et bien sûr la disponibilité en minéraux (Chandlee, 2001).

Un grand nombre de gènes voient leur expression favorisée pendant la sénescence et sont ainsi affublés du titre de *senescence-associated genes* (*SAG*). De façon générale, ils codent pour des protéines pourvues d'activité catabolique et impliquées dans la remobilisation des nutriments ou sont associées au stress ou à la synthèse hormonale (en particulier l'éthylène). Ainsi, outre des protéases et des RNases, on retrouve entre autres la phospholipase D, probablement impliquée dans la dégradation des membranes cellulaires et en particulier celles des thylakoïdes, retrouvées en abondance dans les chloroplastes. De même, l'expression de superoxyde dismutases et de catalases a certainement pour objectif de minimiser les stress associés à la production de ROS au cours du processus de dégradation. L'expression de protéines de défense PR (voir section 1.4.1.8), habituellement associées spécifiquement à l'attaque par des pathogènes, pourrait également s'inscrire dans un dernier effort de protection afin d'assurer la survie de ces cellules jusqu'à ce que tous les nutriments aient été récupérés (voir à ce sujet le paragraphe suivant). Il est à noter que plusieurs protéines codées par les *SAG* n'ont pas de fonction connue et la plupart ne sont pas nécessairement spécifiques à la sénescence, mais sont aussi exprimées à d'autres stades du développement foliaire (Chandlee, 2001).

#### 1.4.1.8 Réponse hypersensible (HR) et résistance aux pathogènes

La HR est habituellement définie comme « la mort rapide des cellules végétales en association avec la restriction de la croissance du pathogène » (Goodman et Novacky, 1994, cité dans Heath, 2000a). Elle survient donc lors de l'invasion par un pathogène et est étroitement associée à la réaction de défense (RD) de la plante. La RD consiste en l'activation de plusieurs lignes de défense visant l'arrêt de la propagation du pathogène, entre autres *via* la mort d'un petit groupe de cellules formant une zone de nécrose à la superficie plus ou moins grande, selon le cas (Heath, 2000b). Outre l'activation de la HR, la RD implique également d'autres mécanismes de défense. Par exemple, la déposition de callose, l'incrustation de lignine et de subérine et l'infiltration de composés phénoliques dans la paroi cellulaire contribuent à son renforcement et ainsi diminuent la pénétration du pathogène, la diffusion de toxines ou l'action d'enzymes microbiennes. Au niveau du cytosol, la synthèse de phytoalexines (des composés antimicrobiens issus du métabolisme secondaire) et de protéines associées à la pathogénèse (*pathogenesis-related*, PR), dont certaines ont des activités enzymatiques anti-fongiques (chitinases,  $\beta$ -1,3-glucanases) susceptibles de dégrader les composés majeurs de la plupart des champignons pathogènes, font aussi partie de l'arsenal défensif (Benhamou et Picard, 2000).

La HR joue un rôle particulièrement important dans le cas des pathogènes biotrophes, c'est-à-dire qui ont obligatoirement besoin d'une cellule vivante pour se multiplier, dont les virus sont un exemple évident (par opposition aux pathogènes nécrotrophes, habituellement des champignons, qui ont besoin d'un tissu mort pour compléter leur cycle de reproduction). En effet, l'induction de la mort de la cellule hôte empêche le pathogène de se multiplier puis d'envahir les cellules avoisinantes. Cependant, il existe aussi plusieurs cas documentés où l'activation de la HR n'empêche pas la progression du pathogène et d'autres cas où le pathogène est arrêté sans qu'il y ait trace de HR (revu par Heath, 2000a; Greenberg et Yao, 2004). Il y a donc des cas où l'« association avec la restriction de la croissance du pathogène » est fautive.

Dans plusieurs cas où la HR est déclenchée par la reconnaissance d'un agent pathogène particulier, nous avons affaire à ce que l'on appelle une interaction « gène-pour-gène »

(revu par Heath, 2000a; Gomez-Gomez, 2004). Cet événement nécessite la présence chez le pathogène d'un caractère de virulence spécifique, le produit d'un gène d'avirulence (*Avr*), et chez la plante une allèle spécifique d'un gène de résistance (*R*). Il a été assumé pendant longtemps que les gènes *R* codaient des récepteurs des produits des gènes *Avr*, dans un modèle où il n'y aurait qu'un seul gène impliqué autant du côté de l'agresseur que du défendeur. Cependant, ce modèle a été récemment remis en question, considérant le fait que très peu de cas où il y a une interaction directe ont pu être identifiés (revu par Gomez-Gomez, 2004). De même, les gènes *Avr* codent des facteurs de virulence permettant à l'agent infectieux une pathogénicité maximale en l'absence du gène *R* chez la plante. Or, les gènes *Avr* sont très peu conservés, alors que les produits des gènes *R* sont limités à quelques motifs protéiques (dont certains sont conservés chez les mammifères, voir section 1.4.4.1). L'hypothèse du « gardien » a donc été proposée, où les protéines *R* seraient impliquées dans la surveillance d'un nombre limité de composants cellulaires constituant les cibles des protéines *Avr*. Cette hypothèse expliquerait la diversité des gènes *Avr* et la conservation des gènes *R* (Gomez-Gomez, 2004). Il est à noter que la RD, et parfois la HR, peuvent aussi être déclenchées par des éliciteurs non spécifiques tels que des oligosaccharides (fragments de la paroi du pathogène), des protéines ou des phospholipides en provenance du microorganisme pathogène, ou des oligogalacturonides libérés de la paroi végétale sous l'action de pectinases fongiques et qui sont reconnus par des récepteurs membranaires (Benhamou et Picard, 2000; Gomez-Gomez, 2004). Cependant, la résistance non spécifique qui en découle (*nonhost resistance*) a lieu le plus souvent en l'absence de mort cellulaire, donc sans avoir recours à la HR (Heath, 2000b).

Du point de vue morphologique, la HR est associée à la vacuolisation, la condensation et la désorganisation du cytoplasme (Roebuck *et al.*, 1978; Bestwick *et al.*, 1995; Mittler *et al.*, 1997). Le confinement du pathogène nécessite une mort cellulaire extrêmement rapide, de sorte que contrairement à la sénescence, le recyclage du contenu cellulaire ne semble pas être une préoccupation. Cependant, le sort des organelles semble variable, puisque qu'une étude a rapporté le gonflement des mitochondries et la perte des structures membranaires internes, mais des chloroplastes intacts (Bestwick *et al.*, 1995), alors que l'autre a rapporté la perte d'intégrité des chloroplastes (qui accumulaient du matériel dense) mais la préservation des mitochondries (Mittler *et al.*, 1997). Il se peut que ces différentes

observations soient dues à des réponses envers des pathogènes différents (bactérie *vs* virus, respectivement). Dans tous les cas, le protoplasme se rétracte éventuellement et ne devient qu'une masse membranaire au contenu indiscernable, rappelant un peu les corps cellulaires retrouvés dans l'apoptose animale (Pennell et Lamb, 1997). La paroi cellulaire s'effondre également (Pennell et Lamb, 1997), possiblement suite à la déshydratation de son contenu et la pression exercée par l'expansion des cellules avoisinantes. Certaines études ont également rapporté la fragmentation internucléosomale de l'ADN nucléaire (Ryerson et Heath, 1996; Wang *et al.*, 1996a; Tada *et al.*, 2001), alors que d'autres n'ont détecté que la fragmentation en gros fragments entre 50 et 300 kb (Levine *et al.*, 1996; Mittler *et al.*, 1997).

L'action de la phytohormone acide salicylique (AS) dans l'établissement de la HR et des RD est à la fois bien connue et ambiguë. En effet, dans les tissus de tabac infectés par le virus de la mosaïque du tabac (*tobacco mosaic virus*, TMV) et accumulant l'AS, on retrouve un gradient d'AS où la concentration la plus élevée est au niveau de la lésion et dans son environnement immédiat (Enyedi *et al.*, 1992). Il a donc été suggéré que l'AS pourrait réguler la taille des lésions à faible dose, et induire la PCD à forte dose. Nous en discuterons plus longuement à la section 1.4.2.2.

#### **1.4.1.9 Stress biotiques, abiotiques et modèles *in vitro***

Outre les exemples de PCD dans le développement normal de la plante et la HR induite en présence de pathogènes (stress biotiques), la PCD peut aussi être induite par des stress environnementaux (abiotiques). Nous avons déjà vu le cas à la section 1.4.1.5 de la formation de l'aérenchyme racinaire en conditions d'hypoxie. L'ozone (O<sub>3</sub>) peut également être particulièrement nocif, et dépendamment de sa concentration et de la durée de l'exposition, il peut induire des chloroses et la sénescence prématurée (expositions chroniques à de faibles doses) ou des lésions nécrotiques rappelant étrangement la HR (expositions ponctuelles à fortes doses). Ce type de PCD semble être causée par la génération de ROS à partir de l'O<sub>3</sub> au contact des membranes cellulaires (Rao *et al.*, 2000). En fait, la plupart si ce n'est tous les stress abiotiques (mais aussi biotiques) comme des

extrêmes de chaleurs, de froid, ou de salinité impliquent les ROS et nous en traiterons plus en détail à la section 1.4.2.1.

L'étude de la PCD a grandement profité de l'utilisation de systèmes de culture cellulaire *in vitro* pour clarifier certains aspects qui auraient été carrément impossibles en utilisant le contexte naturel de la plante. Par exemple, le développement d'un système *in vitro* efficace pour l'étude de la différenciation des TE il y a plus de 20 ans (Fukuda et Komamine, 1980b, a) a permis de faire de cette forme de PCD végétale l'une des mieux caractérisée, l'amenant même au rang de paradigme (Fukuda, 2000). De même, les cellules de la couche de l'aleurone peuvent être isolées sous forme de protoplastes et ainsi soumises à différents traitements hormonaux ou chimiques pour étudier le cours de la PCD (Wang *et al.*, 1996c; Fath *et al.*, 2002). Il va de soi que la pertinence d'utiliser un système *in vitro* dépend de sa capacité à refléter les mécanismes de mort ayant lieu *in vivo*. Puisque la PCD, peu importe sa forme, utilise apparemment des mécanismes de base de la machinerie cellulaire, l'activation de la PCD *in vitro* partage nécessairement des similarités fondamentales avec la mort ayant cours *in vivo* (McCabe et Leaver, 2000).

L'utilisation de cultures cellulaires peut être avantageuse à différents points de vue (voir à ce sujet l'excellente revue de McCabe et Leaver, 2000), et ce particulièrement pour l'étude de la PCD. Ainsi, ces cultures représentent une collection de cellules relativement uniformes, en division rapide et continue. Certaines lignées (i.e. *N. tabacum* cv. BY-2) peuvent même être synchronisées pour procéder à des études reliées au cycle cellulaire. L'obtention de quantités importantes de cellules en peu de temps est aussi grandement favorisée, particulièrement dans le cas de l'étude de la PCD d'un point de vue biochimique, où le matériel vivant est souvent condamné à mourir en peu de temps. De plus, il est facile et rapide de déterminer de façon quantitative (et pas seulement qualitative) la croissance, la viabilité et l'aspect morphologique des cellules cultivées en flacon, et ce sur une période de temps plus ou moins longue. Ce sont encore là des paramètres très importants à surveiller pour les études portant sur la PCD ou les réponses aux stress. Faut-il mentionner que l'induction de la PCD dans les cultures cellulaires se fait de façon relativement uniforme, de sorte que l'on obtient facilement un grand nombre de cellules exécutant à peu près en même temps leur programme de mort. Finalement, considérant le fait que les suspensions

cellulaires sont généralement constituées de cellules indifférenciées et sans organisation spécifique (contrairement à ce que l'on retrouve dans les tissus), elles représentent un niveau de complexité moindre, d'autant plus que l'on peut contrôler avec précision l'environnement de la cellule.

Les cultures cellulaires ont donc été utilisées pour disséquer un grand nombre de réponses cellulaires basales envers différents stimuli ou stress. Par exemple, il est possible d'induire une PCD qui est certainement proche de la HR en utilisant seulement des éliciteurs ou toxines bactériens ou fongiques, ou carrément en cultivant les cellules en présence du pathogène (McCabe et Leaver, 2000). L'implication des ROS dans la PCD végétale a été beaucoup étudiée avec des systèmes *in vitro*, de même que le rôle de la signalisation par le  $\text{Ca}^{2+}$ , et une proportion importante des travaux auxquels nous référerons dans la section qui suit ont été effectués avec des systèmes *in vitro*.

### 1.4.2 Transduction de signal

Comme nous avons pu le constater au cours de notre survol de la PCD végétale, les phytohormones mais aussi les ROS ont un rôle à jouer dans toutes les formes de PCD développementale ou en réponse aux stress. En fait, une bouffée ou émission de ROS, communément appelée *oxydative burst*, est une réponse commune à la majorité des stress biotiques et abiotiques (Overmyer *et al.*, 2003). De même, les ROS jouent un rôle dans la plupart des cas de PCD développementale. Bien que les ROS aient été longtemps considérés comme des sous-produits toxiques du métabolisme cellulaire, il est maintenant reconnu qu'ils jouent un rôle important dans la signalisation d'un grand nombre de systèmes biologiques (Hoeberichts et Woltering, 2003). L'induction de flux ioniques, en particulier le  $\text{Ca}^{2+}$ , à travers la membrane plasmique, est directement impliquée dans l'induction de la bouffée de ROS. En fait, la plupart des cas de PCD développementale ou induite présentent des flux de  $\text{Ca}^{2+}$  en amont de la cascade de signalisation menant à la PCD, collaborant ainsi avec les phytohormones et les ROS (Hoeberichts et Woltering, 2003; Overmyer *et al.*, 2003). Dans cette section, nous tenterons de dresser le portrait de ces événements précoces de signalisation menant à l'induction de la PCD, en tentant de

mettre en évidence les liens entre ces événements. Nous verrons d'abord comment ces fameux ROS, qui font tant couler d'encre, sont générés et métabolisés chez les végétaux. Les phytohormones étant critiques dans la prise de décision menant à la PCD, nous continuerons avec un portrait de leurs modes d'actions, en particulier celles impliquées dans la HR ou des réponses de type HR (puisque cette forme de PCD a été particulièrement étudiée et est donc mieux caractérisée), et ce en relation avec leur action sur la production ou l'accumulation de ROS, leur complément indissociable. Puis, nous verrons l'implication des flux de  $\text{Ca}^{2+}$  dans l'établissement de la PCD et quelques indices suggérant des mécanismes d'action du  $\text{Ca}^{2+}$  similaires à ceux présents chez les animaux.

#### 1.4.2.1 Les ROS et le NO dans la PCD végétale

Comme nous l'avons déjà mentionné, il est maintenant clair que les ROS exercent le rôle de molécule de signalisation chez les végétaux (voir les revues de Neill *et al.*, 2002; Hoeberichts et Woltering, 2003; Overmyer *et al.*, 2003; Apel et Hirt, 2004; Laloi *et al.*, 2004; Wendehenne *et al.*, 2004). Au cours de l'évolution, les organismes adaptés à la vie en aérobie ont dû développer des stratégies pour rendre inoffensifs les ROS générés obligatoirement par des processus métaboliques tels que la respiration et la photosynthèse. Lorsque la production de ROS dépasse la capacité cellulaire à les détoxifier, il survient un stress oxydatif. Or, les plantes ont aussi évolué de façon à percevoir les perturbations du métabolisme oxydatif et les interpréter comme étant des stress auxquels elles doivent réagir pour survivre (Laloi *et al.*, 2004).

Dans la plante, les ROS peuvent être générés de différentes façons. Au niveau intracellulaire, l'intégration de stress environnementaux peut se faire *via* les chloroplastes, où la lumière, la température ou la disponibilité en eau ou en nutriments affectent l'efficacité du transport des électrons de la chaîne photosynthétique. Suivant un stress naturel, comme par exemple sous haute intensité lumineuse où l'absorption de l'énergie lumineuse excède la capacité d'assimilation du  $\text{CO}_2$ , différents ROS peuvent être générés par les chloroplastes [l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ), le radical superoxyde ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et le radical hydroxyle ( $\text{OH}^{\bullet}$ ); voir les revues de Apel et Hirt, 2004;

Laloi *et al.*, 2004]. Contrairement aux mammifères, la production de ROS dans les mitochondries est plutôt faible, entre autres parce que les plantes sont pourvues d'un sentier alternatif de transport des électrons composé de l'alternative oxidase (AOX; voir section 1.4.2.2.1) qui aide à réduire la production mitochondriale de ROS (Overmyer *et al.*, 2003; Apel et Hirt, 2004; Laloi *et al.*, 2004). Cela n'exclut cependant pas l'implication des mitochondries dans l'action des ROS. D'ailleurs, l'identification chez les plantes d'une thiorédoxine localisée au niveau des mitochondries (Laloi *et al.*, 2001) laisse supposer un mécanisme de détoxification des ROS similaire aux mammifères au niveau de cet organite. En effet, chez les mammifères, les ROS sont générés principalement dans les mitochondries et leur production est contrôlée par la thiorédoxine-2 (TRX-2). Celle-ci joue un rôle important dans l'élimination des ROS des mitochondries et dans la régulation de l'apoptose dépendante des mitochondries, probablement *via* une interaction directe avec le *cytc*. L'absence de la protéine (toujours chez les mammifères) conduit d'ailleurs à une augmentation des ROS intracellulaires et à la sortie du *cytc* (Laloi *et al.*, 2004).

Dans le cas de l'invasion par un pathogène, la cellule utilise une autre stratégie, soit la production de  $H_2O_2$  et de  $O_2^{\bullet-}$  dans l'apoplaste par une oxydase NADPH-dépendante reliée à la membrane plasmique, et potentiellement par des peroxydases et amines oxydases reliées à la paroi (Apel et Hirt, 2004; Laloi *et al.*, 2004). Fait intéressant, la NADPH-oxydase est similaire à celle retrouvée chez les mammifères dans les phagocytes et les lymphocytes B, qui utilisent les ROS qu'elle génère pour tuer des microorganismes pathogènes. Il semble donc que les animaux et les végétaux ont en commun l'utilisation d'un moyen universel, l'oxydation, pour s'attaquer rapidement et efficacement à l'intégrité de la matière organique (Apel et Hirt, 2004). En outre, la régulation de l'enzyme végétale pourrait être similaire à celle de l'enzyme animale, puisque des ROPs (*Rho-related GTPases from plant*), une classe de protéines végétales proche de la famille des protéines Rac des mammifères (dont Rac2 est un régulateur clé de la NADPH-oxydase), induisent dans les cellules végétales la production de  $H_2O_2$  et l'*oxydative burst*, possiblement en activant la NADPH-oxydase (Agrawal *et al.*, 2003).

Outre leurs rôles dans la signalisation, les ROS peuvent avoir des effets délétères directs, entre autres au niveau de l'ADN, des protéines et des lipides. Les plantes sont donc

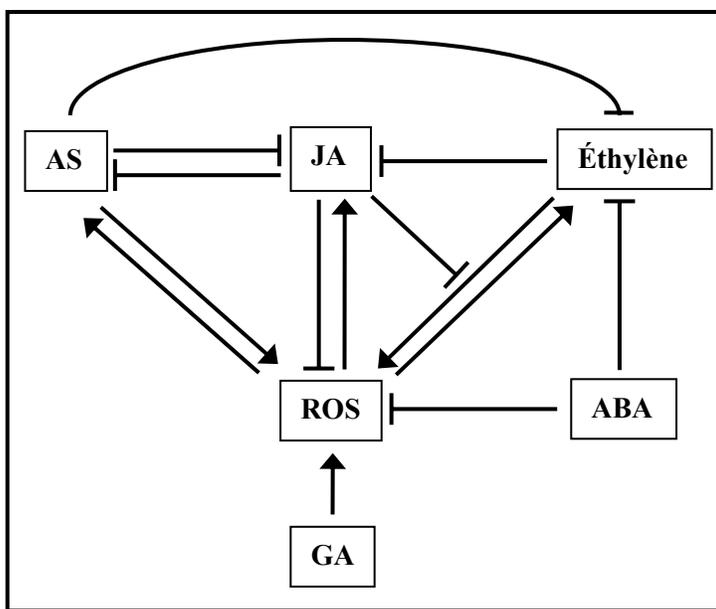
pourvues d'une vaste gamme de moyens, enzymatiques ou non, pour détoxifier les ROS. Parmi les antioxydants majeurs se trouvent l'ascorbate et la glutathione (GSH), mais aussi des composés organiques issus du métabolisme secondaire tels que les flavanoïdes, les alkaloïdes, les caroténoïdes et le tocopherol. Du côté enzymatique, on retrouve la superoxyde dismutase (SOD), l'ascorbate peroxydase (APX), la glutathione peroxydase (GPX) et la catalase (CAT). Contrairement à la plupart des organismes, les végétaux possèdent plusieurs isoformes de la SOD et l'APX, qui sont localisées spécifiquement dans différents compartiments cellulaires. Quant aux deux autres enzymes, la GPX est cytosolique alors que la CAT est localisée dans les peroxisomes (Apel et Hirt, 2004).

De son côté, l'oxyde nitrique (NO) est un gaz dont la fonction de second messager est bien caractérisée chez les mammifères, mais il est aussi un joueur important chez les végétaux. En effet, il est requis pour la mort induite par les ROS (Wendehenne *et al.*, 2004), mais il agit aussi de façon générale dans différents aspects du développement (Neill *et al.*, 2003). Le NO peut être synthétisé dans les tissus végétaux par des NO synthases ou des nitrate réductases et semble interagir avec les sentiers de signalisation de l'AS et l'AJ (voir Wendehenne *et al.*, 2004). La transduction de signal par le NO impliquerait les second messagers GMPc, ADPRc et le  $Ca^{2+}$  (Neill *et al.*, 2003; Wendehenne *et al.*, 2004). La production de niveaux élevés de NO a été détectée dans des cultures cellulaires soumises à l'attaque d'un pathogène (Clarke *et al.*, 2000) ou d'un éliciteur fongique (Lamotte *et al.*, 2004), et il a pu être démontré que ce NO contribue à l'induction de la PCD (Lamotte *et al.*, 2004). De plus, un apport exogène de NO (Saviani *et al.*, 2002) ou de NO en combinaison avec d'autres ROS (Delledonne *et al.*, 2001; de Pinto *et al.*, 2002) peut induire la PCD dans des suspensions cellulaires. Cependant, au cours de la HR naturelle, le NO ne s'accumule pas avant mais plutôt pendant la PCD, et ce dans l'espace extracellulaire et subséquent dans le cytoplasme des cellules adjacentes au site d'infection initial, lesquelles meurent quelques temps plus tard (Zhang *et al.*, 2003). Il a donc été postulé que le NO pourrait faciliter la propagation de la HR d'une cellule à l'autre. À l'opposé, le NO protège les cellules de la couche de l'aleurone contre l'induction de la PCD par les gibbérellines (Beligni *et al.*, 2002). La protection conférée par le NO pourrait provenir d'un effet antioxydant dû à l'augmentation de la CAT, de la SOD, de la glutathione S-transférase et de l'AOX (Beligni *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2002; Polverari *et al.*, 2003). Bien que d'autres

recherches soient nécessaires pour clarifier le mode d'action de ce gaz, le NO est vraisemblablement un modulateur bifonctionnel de la PCD végétale capable de stimuler ou inhiber le processus, et il est probable que ce soient les communications entre le NO et les autres pro- ou anti-oxydants qui déterminent le sort de la cellule (Wendehenne *et al.*, 2004).

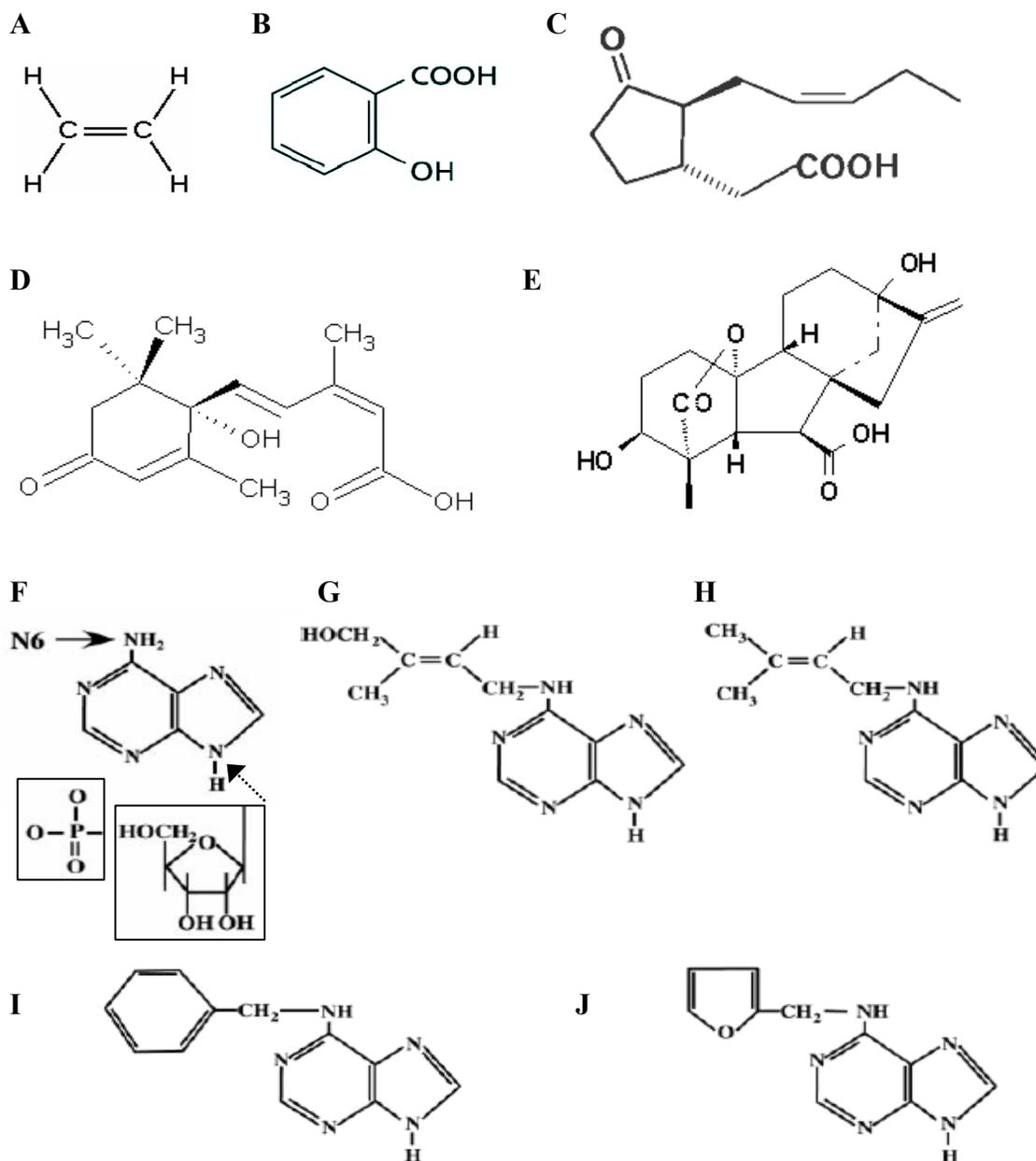
#### 1.4.2.2 Phytohormones

Les phytohormones sont des composés organiques synthétisés dans une partie de la plante, puis transportés vers une autre partie où ils produisent un effet physiologique à très faible concentration. En effet, les phytohormones se retrouvent habituellement dans les tissus végétaux à des concentrations de moins de 1  $\mu\text{M}$  (Raven *et al.*, 1999). Les mécanismes par lesquels elles agissent sont loin d'être parfaitement compris, d'autant plus qu'il apparaît maintenant évident que leurs sentiers de transduction de signal ne sont pas linéaires et indépendants, mais bien au contraire s'entrecroisent pour former des interactions et des synergies complexes (Overmyer *et al.*, 2003). Nous tenterons ici de démystifier, dans la mesure où les connaissances actuelles le permettent, la complexité de ces interactions dans le contexte de la PCD. La Figure 1-10 résume les différentes interactions (*crosstalk*) ayant lieu entre certaines phytohormones impliquées de près ou de loin dans la PCD, alors que la Figure 1-11 présente les structures des phytohormones traitées dans cette section.



**Figure 1-10 : Complexité des interactions hormonales dans le contrôle de la PCD végétale en relation avec les ROS.**

La production de ROS constitue un signal pour la synthèse d'AS, d'AJ et d'éthylène. Au site d'infection par un pathogène, la signalisation par l'AJ est supprimée par l'AS et l'éthylène. L'AS produit activerait une cascade de phosphorylation menant à l'accumulation d'encore plus de ROS (*via* une boucle d'amplification) de façon à favoriser la mort cellulaire. L'éthylène favorise aussi en retour la production de ROS. Cette seconde vague de ROS pourrait contribuer à la propagation de la PCD aux cellules voisines. Dans les cellules un peu plus loin en périphérie, le plus faible niveau d'AS induit l'expression des PR et autres gènes de défense, mais inhibe la production d'éthylène *via* sa capacité à inhiber la dernière étape du sentier menant à la synthèse de l'éthylène. La signalisation par l'éthylène menant à la production de ROS est également contrecarrée par l'AJ. Bien que l'AS et l'AJ collaborent pour restreindre la propagation des lésions, l'AJ peut avoir un effet antagoniste sur l'accumulation de l'AS, possiblement dans le but d'éviter l'accumulation d'AS à un niveau suffisamment élevé pour l'induction de la PCD. Dans les cellules de l'aleurone, le GA augmente la susceptibilité aux ROS, qui sont produits en grande quantité par les glyoxysomes, mais l'action antagoniste de l'ABA sur la signalisation par l'éthylène prévient la synthèse de ROS et ainsi l'autolyse et la mort liées aux ROS. Les interactions peuvent différer selon le stress auquel la plante est soumise. Consulter le texte pour d'autres détails.



**Figure 1-11** : Structure chimique des phytohormones impliquées dans la PCD végétale.

**A)** Éthylène. **B)** Acide salicylique (AS). **C)** Acide jasmonique (AJ). **D)** Acide abscissique (ABA). **E)** Acide gibbéréllique (GA). **F)** Adénine, la structure à la base des cytokinines par une substitution en position N<sup>6</sup> (flèche pleine). Les cytokinines peuvent aussi être sous la forme de nucléoside (le plus souvent par l'ajout d'un pentose, flèche pointillée) ou nucléotide (par l'ajout de un ou plusieurs groupement phosphate au pentose). **G)** *Trans*-zéatine (Zea). **H)** Isopentényl adenine (iP). **I)** 6-benzylaminopurine (Bap). **J)** Kinétine (Kin).

#### 1.4.2.2.1 Acide salicylique

L'AS est un acide phénolique (Figure 1-11) bien connu pour son rôle dans les RD envers les pathogènes, y compris la HR (voir section 1.4.1.8). En effet, la réponse nécrotique locale s'accompagne le plus souvent de l'établissement d'une réponse systémique acquise (*systemic acquired resistance*, SAR), qui permet véritablement d'immuniser la plante entière contre de futures infections (Ryals *et al.*, 1996). Suivant l'invasion par un pathogène, l'AS s'accumule initialement aux sites d'infection en concentration très élevée (jusqu'à 70  $\mu\text{M}$ ), puis plus tard dans le reste de la plante à des concentrations plus faibles. Des plantes transgéniques ne pouvant accumuler l'AS dû à l'expression de la salicylate hydroxylase (*nahG*) bactérienne ne peuvent établir la SAR. Il semble que l'induction des PR par l'AS serait à l'origine de la SAR. L'induction des PR et de la SAR peuvent d'ailleurs être simulés par l'apport exogène d'AS (Dong, 1998; Murphy *et al.*, 1999; Alvarez, 2000).

Il semble également que la forte accumulation d'AS aux sites d'infection joue un rôle dans l'établissement de la HR. En effet, la majorité des mutants chez lesquels la signalisation par l'AS est constitutivement active développent des lésions nécrotiques spontanées, mimant ainsi la HR. Ils appartiennent à une plus large classe de mutants, appelés *lesion mimic mutants* (LMM), qui présentent des problèmes au niveau des sentiers contrôlant l'initiation de la PCD (mutants d'initiation, présentant des lésions nécrotiques localisées et définies) ou la suppression de la PCD (mutants de propagation, incapables de contrôler l'expansion des lésions; voir la revue de Lorrain *et al.*, 2003). Ces mutants, qui présentent également une expression constitutive de leurs gènes de défense PR, possèdent une résistance accrue envers différents pathogènes (Lorrain *et al.*, 2003). Il se pourrait donc que tout comme dans le cas du TMV et du gradient d'AS dont il a été fait mention à la section 1.4.1.8, un niveau accru d'AS chez ces mutants entraîne une SAR constitutive, mais que de temps à autre une production locale incontrôlée conduite à l'induction de la PCD, mimant la HR. De ce fait, plusieurs des LMM ont été croisés avec un mutant ne pouvant accumuler l'AS (voir paragraphe précédent) de façon à tester le rôle de cette hormone dans l'initiation de la HR. Bien que le phénotype de mort cellulaire spontanée ait pu être aboli chez plusieurs mutants, d'autres ne présentaient qu'une réduction de la taille des lésions, ou même aucun effet (Lorrain *et al.*, 2003). Prises toutes ensemble, ces données portent à croire qu'à forte

concentration au niveau du site d'infection, l'AS collabore avec d'autres signaux pour induire la PCD et que suivant son transport en périphérie de la lésion, où l'hormone se retrouve alors en plus faible concentration, elle deviendrait un signal de survie favorisant l'établissement de la bordure de la lésion (Lam, 2004).

Il est à noter que l'induction de la PCD par l'AS peut être générée *in vitro* avec des suspensions cellulaires, de faibles doses permettant l'induction des PR sans compromettre la viabilité ni la croissance, alors que de fortes doses sont toxiques (Norman *et al.*, 2004), rappelant le cas du gradient d'AS autour des lésions en réaction au TMV (Enyedi *et al.*, 1992). Il semblerait que la signalisation par l'AS implique la phosphorylation de protéines, et effectivement une *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) activée par l'AS a récemment été découverte (voir la revue d'Alvarez, 2000). La signalisation par les kinases mènerait à l'accumulation des ROS, qui sont très importants non seulement dans la HR, mais aussi dans plusieurs des cas de PCD végétale. Les ROS peuvent à leur tour stimuler la production d'AS et cette possible boucle d'autoamplification pourrait servir à amplifier le signal généré par l'AS (Alvarez, 2000; Beers et McDowell, 2001).

L'AS réduit aussi la synthèse d'ATP en inhibant la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie (Xie et Chen, 1999; Maxwell *et al.*, 2002) et cette baisse contribue possiblement à son activité cytotoxique puisque chez les animaux, une telle baisse du niveau d'ATP peut être suffisante pour induire l'apoptose (Eguchi *et al.*, 1997; Leist *et al.*, 1997; Izyumov *et al.*, 2004). Dans des cultures cellulaires de tabac, l'AS peut à forte dose inhiber le transport des électrons vers l'ubiquinone, alors qu'à plus faible concentration le transport des électrons n'est bloqué qu'en partie seulement, étant plutôt détourné à partir de l'ubiquinone vers l'AOX (Norman *et al.*, 2004). Il était déjà connu que l'AS pouvait induire l'AOX (Rhoads et McIntosh, 1993; Maxwell *et al.*, 2002), la seule enzyme du sentier alternatif de transport des électrons (un sentier spécifique aux végétaux), qui catalyse le transfert des électrons vers l'oxygène moléculaire. Le sentier alternatif découple donc le transport des électrons de la synthèse d'ATP, mais aurait pour fonction possible la prévention de la production de ROS dans des conditions où le transport des électrons par le sentier standard ne fournit pas à la demande (Siedow et Umbach, 1995). Toute l'énergie non utilisée pour la synthèse d'ATP est perdue sous forme de chaleur. D'ailleurs, l'AS

joue un rôle dans le contrôle de la production de chaleur dans les inflorescences des espèces thermogéniques, la chaleur permettant la volatilisation de composés odorants dont la fonction est l'attraction de pollinisateurs (Raskin *et al.*, 1987; Raskin *et al.*, 1989).

Bien que les concentrations dont on parle ici (*in vitro*) sont beaucoup plus élevées que les concentrations endogènes d'AS, il n'en demeure pas moins que l'AOX est bel et bien impliquée dans le contrôle négatif de la PCD *in vivo* (Ordog *et al.*, 2002; Robson et Vanlerberghe, 2002; Vanlerberghe *et al.*, 2002). Il est donc probable que l'effet protecteur de l'AS contre la PCD (pour l'établissement de la bordure de la lésion dans le cadre de la HR) se fasse *in vivo* par le découplage dans la mitochondrie du transport des électrons vers l'AOX. Bien que ce découplage diminue la production d'ATP, il est probable que le bénéfice engendré par la diminution de la production de ROS déplace l'équilibre vers la survie. Considérant que les données de Norman *et al.* (2004) indiquent que les cultures de tabac accumulent l'AS de façon transitoire seulement, le niveau d'accumulation étant proportionnel à la concentration appliquée, il est possible qu'il en soit de même *in vivo*, et dans ce cas la baisse de production d'ATP ne serait que temporaire. Par contre, à concentration plus élevée (comme par exemple au site initial d'infection), l'inhibition complète du transport des électrons dans la mitochondrie ne peut pas être viable pour la cellule, induisant la PCD (HR).

#### 1.4.2.2.2 Cytokinines

Les cytokinines sont des dérivés de l'adénine, présentant une substitution en position N<sup>6</sup> (Figure 1-11). Elles sont impliquées dans la croissance et la différenciation (en collaboration avec les auxines) dans à peu près tous les aspects du développement végétal et ont donc à première vue peu à voir avec la PCD. Cependant, leur niveau diminue dans les organes en sénescence. De même, un apport exogène de ces phytohormones peut renverser (ou à tout le moins retarder substantiellement) la sénescence de certains organes tels que les feuilles et les pétales (Mok, 1994) et en ce sens constituent des régulateurs négatifs de la PCD. Il est toutefois à noter qu'un tel rôle semble vraiment restreint aux organes en sénescence puisqu'un effet anti-PCD des cytokinines n'a jamais été rapporté pour d'autres cas de PCD végétale. Le mode d'action par lequel elles agissent n'est pas

clair et concerne essentiellement le métabolisme des chloroplastes (Sherameti *et al.*, 2004). Cet effet anti-sénescence des cytokinines et leur diminution au cours de ce processus ont mené au postulat selon lequel la diminution du niveau de cytokinine en dessous d'un certain seuil devrait déclencher la sénescence. Ce postulat a pu être infirmé récemment avec l'obtention de plantes transgéniques surexprimant de façon constitutive différentes isoformes de cytokinine oxidase/désydrégénase (CKX), l'enzyme catalysant l'inactivation irréversible des cytokinines. Contre toute attente, ces plantes, dont les niveaux de cytokinines sont inférieurs à la normale (de 30 à 45%), ne présentent pas de sénescence foliaire accélérée (Werner *et al.*, 2003). Le postulat était donc faux et les auteurs de l'étude ont suggéré qu'un faible niveau de cytokinines est peut-être requis pour l'établissement de la sénescence, mais ne constitue pas un signal pour son induction (Werner *et al.*, 2003).

Étonnamment, des résultats récents ont démontré que de hautes concentrations de cytokinines peuvent bloquer la prolifération cellulaire et induire la PCD dans des suspensions cellulaires de carottes, d'*A. thaliana* (Carimi *et al.*, 2003; Carimi *et al.*, 2004) et de tabac (Mlejnek et Procházka, 2002; Mlejnek *et al.*, 2003). La mort est accompagnée de fragmentation internucléosomale de l'ADN nucléaire et de d'autres caractéristiques de l'apoptose suggérant qu'il s'agirait de PCD. L'expression précoce d'un gène codant pour une protéase dont l'expression est habituellement spécifique à la sénescence (*SAG12*) suggère qu'il pourrait s'agir d'une forme accélérée de sénescence (Carimi *et al.*, 2004). Bien que cet effet des cytokinines sur les cellules en culture soit surprenant, des effets toxiques des cytokinines ont aussi été rapportés dans certains cas de culture de tissu *in vitro* ou même pour des plantes (Ainley *et al.*, 1993; Martineau *et al.*, 1994; McCabe *et al.*, 2001; Lee et Chen, 2002; Rakwal *et al.*, 2003). Par exemple, un bon nombre d'expérimentations ont tenté de retarder la sénescence foliaire *via* la production d'une enzyme permettant la biosynthèse des cytokinines, l'isopentenyl transférase (IPT), et ce faisant certains effets toxiques ont parfois été observés. Ainsi, chez la laitue, cette stratégie permet effectivement de retarder la sénescence des vieilles feuilles, mais au contraire les jeunes feuilles présentent une sénescence accélérée (McCabe *et al.*, 2001), un phénomène également rapporté chez le tabac (Ainley *et al.*, 1993). Ces données vont dans le même sens que celles rapportées par Carimi et collaborateurs (Carimi *et al.*, 2003), qui ont montré que les cellules en division sont plus affectées par les cytokinines que les cellules quiescentes.

Cela est peut-être dû au fait que la cytokinine doit être métabolisée pour exercer sa toxicité (Mlejnek *et al.*, 2003).

#### 1.4.2.2.3 Acide jasmonique, éthylène, ABA et GA

L'acide jasmonique (AJ) est reconnu pour son rôle dans la réponse aux blessures causées par des insectes ou autres herbivores. L'AJ et son ester méthylé, le méthyle jasmonate, sont des composés cyclopentaniques qui dérivent de l'acide linoléique (Figure 1-11). Étant très volatil, le méthyle jasmonate est associé à une certaine forme de « communication » entre plantes voisines, notamment l'induction à distance de mécanismes de défense (Creelman et Mullet, 1997). L'AJ est aussi impliqué dans les RD envers les microorganismes pathogènes, puisque des mutants déficients pour la production ou la perception de l'AJ présentent une plus grande susceptibilité envers des pathogènes fongiques et bactériens de type nécrotrophe. De même, la surexpression d'un gène de biosynthèse de l'AJ confère une résistance accrue envers le champignon nécrotrophe *Botrytis cinerea* (Seo *et al.*, 2001; Kunkel et Brooks, 2002). L'AJ joue aussi un rôle particulier dans la HR induite par l'ozone (O<sub>3</sub>). En effet, l'O<sub>3</sub> induit la biosynthèse d'AJ et des traitements avec de l'AJ exogène inhibent la propagation de la mort induite par l'O<sub>3</sub> chez un mutant particulièrement sensible à l'O<sub>3</sub>. Il semblerait donc que l'AJ soit une composante importante d'un sentier qui régule négativement la PCD et pourrait collaborer avec l'AS (lorsque celui-ci est à faible concentration) dans l'établissement de la bordure des lésions (Hoeberichts et Woltering, 2003; Overmyer *et al.*, 2003). Cet effet pourrait venir de l'atténuation de la production de ROS en diminuant la sensibilité de la plante envers l'éthylène. En effet, l'AJ induit les gènes codant pour des récepteurs de l'éthylène (Schenk *et al.*, 2000). Il a été proposé qu'en présence d'un grand nombre de récepteurs, dont certains se retrouvent inoccupés par l'éthylène, la cellule devienne insensible à la présence de l'hormone (nous verrons à la section 1.4.2.2.4 qu'en l'absence de l'hormone, le récepteur est constitutivement actif et régule négativement la réponse à l'éthylène). De cette façon, l'AJ pourrait contribuer à ralentir la propagation éthylène-dépendante des lésions en réduisant l'accumulation éthylène-dépendante de ROS (Overmyer *et al.*, 2003).

De son côté, l'éthylène (Figure 1-11) semble un inducteur de la PCD à large spectre et l'implication de cette hormone gazeuse dans les différentes formes de PCD a déjà été mentionnée au passage dans la section 1.4.1. Rappelons qu'en plus de favoriser la maturation des fruits et la sénescence de différents organes, l'éthylène déclenche la PCD médiée par l'O<sub>3</sub> et des pathogènes (donc reliée à la HR), mais est aussi impliquée dans la PCD des cellules de l'endosperme et la formation de l'aérenchyme dans le cortex racinaire (Kieber, 1997; Kunkel et Brooks, 2002; Hoeberichts et Woltering, 2003). Cependant, il se pourrait bien que dans plusieurs cas, l'éthylène soit requise mais non suffisante pour que la cellule procède à l'exécution d'un programme de mort (Hoeberichts et Woltering, 2003). À l'opposé, il a aussi été rapporté que la HR puisse se développer normalement chez des mutants insensibles à l'éthylène, suggérant qu'il pourrait exister un sentier de mort indépendant de l'éthylène (Overmyer *et al.*, 2003). Finalement, la stimulation de la PCD par l'éthylène serait possiblement due à une plus grande production de ROS (Hoeberichts et Woltering, 2003; Overmyer *et al.*, 2003). Ainsi, l'utilisation d'inhibiteurs de la biosynthèse de l'éthylène ou de sa perception peuvent conduire à l'abolition de la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de la mort, démontrant un rôle critique de l'éthylène dans certains cas de PCD végétale (De Jong *et al.*, 2002). Des interactions positives entre l'éthylène et l'AJ ont aussi été suggérées dû au fait que beaucoup de gènes peuvent être induits par les deux hormones, parfois même en synergie, et que la signalisation par les deux hormones est strictement requise pour certains de ces gènes (voir la revue de Kunkel et Brooks, 2002). En fait, il se pourrait bien que l'AJ, tout comme l'AS et potentiellement les cytokinines, exerce des fonctions antagonistes selon les circonstances. En effet, la PCD induite par la fumonisin-B1 (considérée comme un modèle de la HR) requiert la signalisation par l'AJ et un analogue structural et fonctionnel de la phytohormone (la coronatine) ou l'AJ lui-même peuvent induire des symptômes chlorotiques et la sénescence (Creelman et Mullet, 1997; Overmyer *et al.*, 2003).

Nous avons déjà mentionné à la section 1.4.1.4.2 que l'ABA pouvait réguler négativement la production d'éthylène dans l'endosperme amylicé; l'hypothèse actuelle stipule que la balance entre ces deux hormones permet le déclenchement de la PCD au moment approprié pendant le développement de l'endosperme (Hoeberichts et Woltering, 2003). L'ABA est aussi un antagoniste du GA dans les cellules de l'aleurone et cet antagonisme opérerait *via*

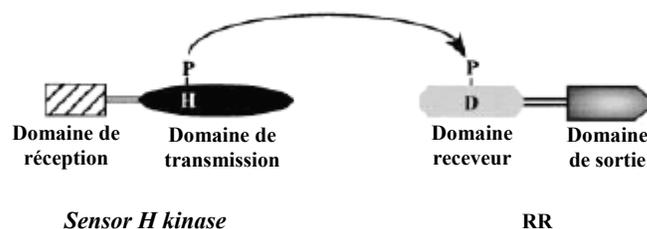
la régulation de l'accumulation des ROS (détaillé à la section 1.4.1.4.3). Il est à noter que l'ABA et les gibbérellines ont d'autres rôles dans le développement qui ne sont pas reliés à la PCD et qui ne font pas l'objet de cette revue (consulter notamment Raven *et al.*, 1999).

#### 1.4.2.2.4 Les récepteurs des phytohormones

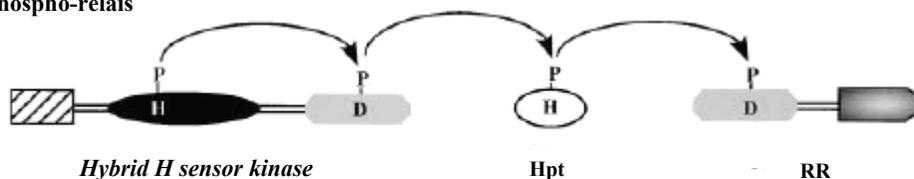
Parmi les phytohormones pouvant jouer un rôle dans la PCD, seules les cytokinines et l'éthylène ont pu à ce jour être associées à des récepteurs, soit au niveau de la membrane plasmique ou au niveau intracellulaire (Romanov, 2002; Napier, 2004). Dans cette section-ci, nous nous attarderons brièvement à ces récepteurs et le lecteur est référé à plusieurs excellentes revues pour plus de détails (Hutchison et Kieber, 2002; Romanov, 2002; Wang *et al.*, 2002; Chang, 2003; Grefen et Harter, 2004; Guo et Ecker, 2004; Klee, 2004; Napier, 2004).

La transduction de signal par les cytokinines repose sur un système similaire au *two-component response system* (TCS) bactérien, dont les composantes sont résumées à la Figure 1-12. Les bactéries utilisent ce système pour la perception de leur environnement et il répond à une vaste gamme de stimuli. Il est constitué d'abord d'une *sensor histidine* (His) *kinase* pourvue de deux domaines aux fonctions différentes, soit un domaine de réception (*input*) qui, suivant la détection d'un signal, entraîne une modification de son domaine de transmission (*transmitter*) et de l'activité His kinase dont ce domaine est pourvu. Il s'ensuit alors une autophosphorylation sur un résidu His conservé, puis le phosphate est transféré (relayé) à un résidu aspartate (Asp) conservé sur le domaine receveur (*receiver*) d'un deuxième composant du système, le *response regulator* (RR). Beaucoup de RR contiennent aussi un domaine de sortie (*output*), dont l'activité, typiquement en tant que facteur de transcription, est régulée par le statut de phosphorylation du domaine de réception.

**A** *Two-component response system simple*



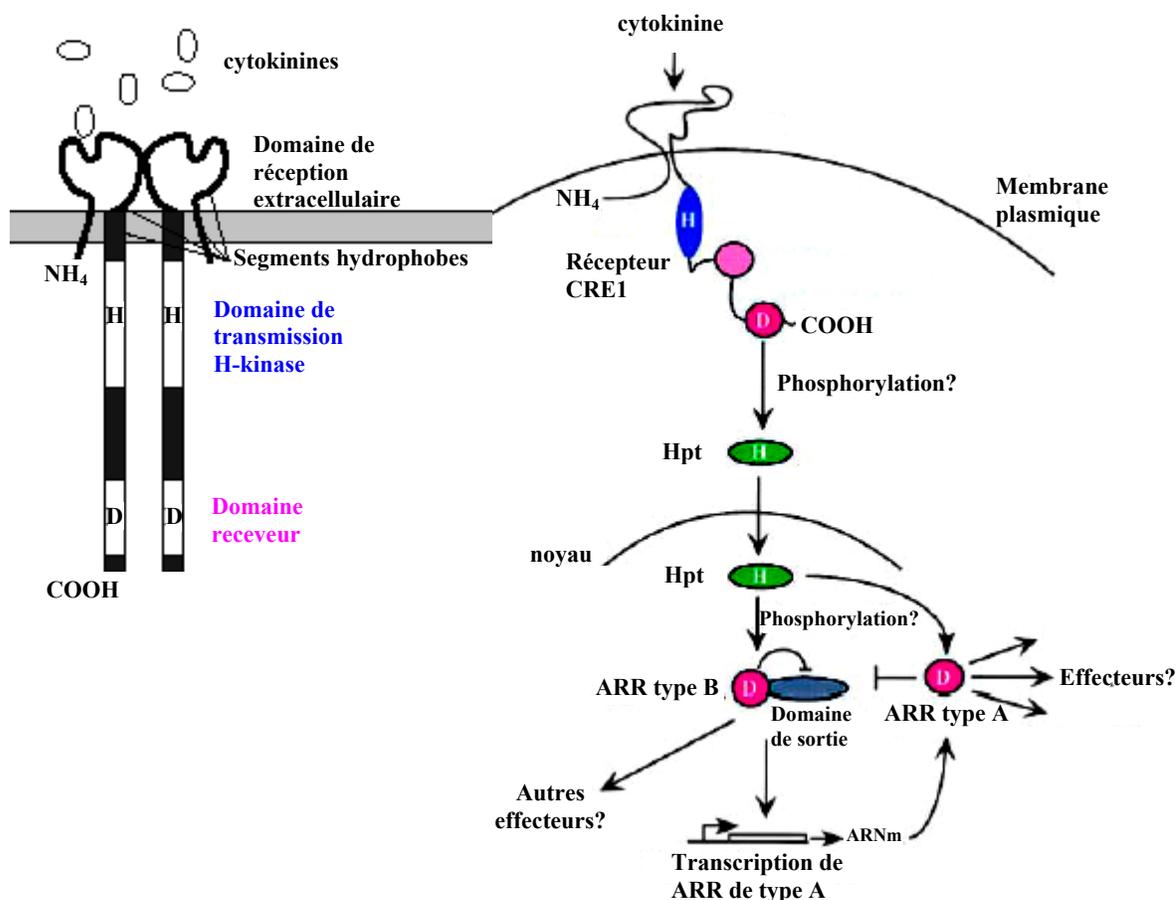
**B** *Phospho-relais*



**Figure 1-12** : Représentation schématique des *two-component response system* (TCS) bactériens et eucaryotes.

**A)** Le TCS de base retrouvé chez les procaryotes. **B)** Le système du phospho-relais à plusieurs étapes. Voir le texte pour les détails (P : groupement phosphate; H : résidu histidine conservé; D : résidu aspartate conservé; Hpt : *histidine phosphotransfer*; RR : *response regulator*). Tiré de Hutchison et Kieber (2002).

Chez les eucaryotes, le TCS est plutôt un phospho-relais à plusieurs étapes (Figure 1-12B). En plus de l'*hybrid histidine sensor kinase*, qui est pourvue d'un domaine de récéption fusionné à son domaine de transmission, et du RR, il s'ajoute une troisième composante (Hpt) dont la fonction est le relais du phosphate du domaine de récéption de l'*hybrid histidine sensor kinase* vers celui du RR, et ce *via* un domaine appelé *His phosphotransfer*. Chez *A. thaliana*, les RR (ARR) sont du type A ou du type B. Les ARR de type B sont des facteurs de transcription qui, suivant leur activation par le Hpt, vont favoriser la transcription des gènes codant pour les ARR de type A. Ceux-ci sont dépourvus d'un domaine de sortie, mais leur domaine de récéption leur permet d'être activés suivant le transfert d'un groupement phosphate par un Hpt. Les gènes codant pour les ARR de type A sont rapidement induits suivant la perception des cytokinines. Cependant, les cibles de ces protéines sont majoritairement inconnues. La Figure 1-13 présente un modèle de la transduction de signal par les cytokinines.



**Figure 1-13** : La transduction de signal par les cytokinines *via* le phospho-relais à plusieurs étapes.

Les récepteurs de cytokinines tel que CRE1 fonctionnent probablement en dimère de façon à procéder à une phosphorylation mutuelle, et ce au niveau de la membrane plasmique (détaillé dans la partie de gauche). La liaison d'une cytokinine active le domaine de transmission (en bleu), ce qui entraîne l'autophosphorylation puis le transfert du phosphate au domaine receveur (rose). Le relais du phosphate est ensuite assuré par l'*histidine phosphotransfer* (Hpt; en vert), qui migre au noyau pour activer les ARR (*response regulator*) de type B [leur domaine de sortie (*output*) est d'ordinaire inhibé par le domaine receveur en l'absence de groupement phosphate sur ce dernier]. Ceux-ci favorisent alors la transcription des ARR de type A (dépourvus de domaine de sortie), dont les activités sont mal connues, mis à part l'inhibition de leur propre transcription. Voir le texte pour d'autres détails. Tiré de Romanov (2002; gauche) et de Hutchison et Kieber (2002; droite). P : groupement phosphate; H : résidu histidine conservé; D : résidu aspartate conservé.

La signalisation par l'éthylène est encore mal comprise, bien que cette hormone fut la première pour laquelle des récepteurs aient été identifiés de façon irrévocable (Napier, 2004). Sans entrer dans tous les détails, mentionnons seulement que ces récepteurs sont très similaires aux *hybrid histidine sensor kinase*, mais sont dépourvus du domaine de réception (*input*) et sont localisés au niveau de la membrane du RE. En l'absence d'éthylène, le récepteur serait vraisemblablement constitutivement actif et ainsi favoriserait l'activation d'un sentier de MAP kinases régulant négativement la réponse à l'éthylène. La liaison de l'éthylène au récepteur (au niveau d'une poche hydrophobe de la portion N-terminale, en présence de cuivre comme co-facteur) entraînerait l'inactivation de son ligand (CTR1, une MAPKKK), et favoriserait ainsi la réponse à l'éthylène (Wang *et al.*, 2002; Chang, 2003; Grefen et Harter, 2004; Guo et Ecker, 2004; Klee, 2004).

### 1.4.2.3 Implication du $\text{Ca}^{2+}$ dans la PCD végétale

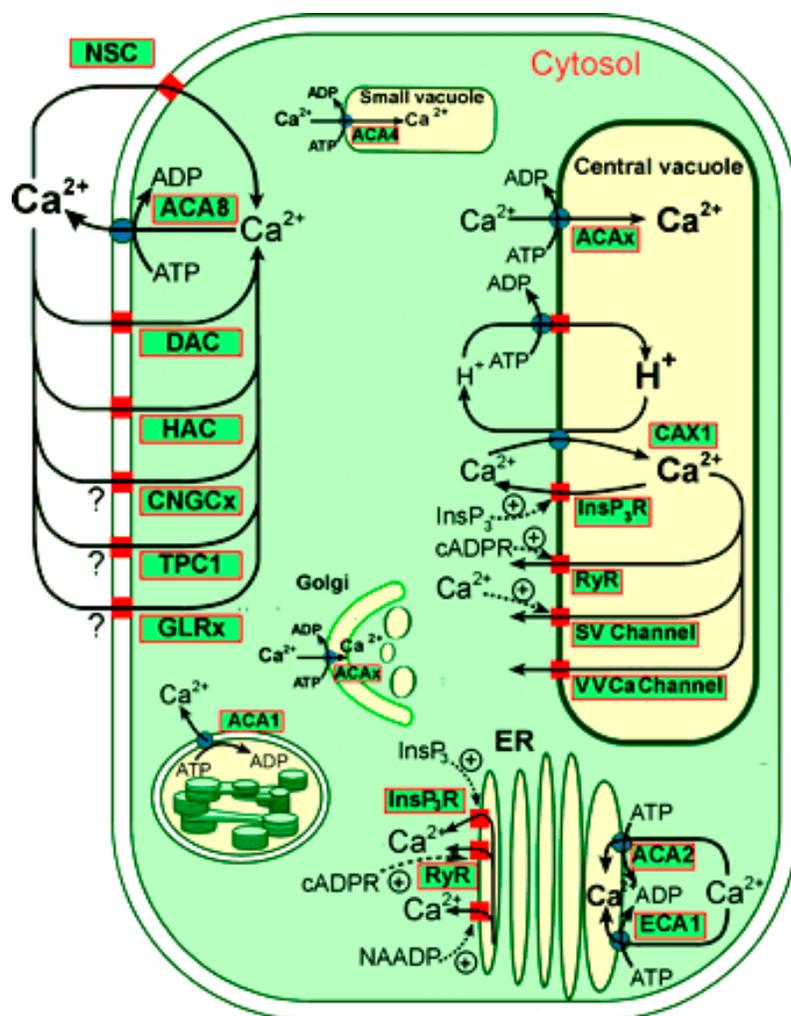
Le  $\text{Ca}^{2+}$  est un messager intracellulaire quasi-universel contrôlant une vaste gamme de processus cellulaires et son rôle dans l'apoptose animale a déjà été abordé à la section 1.3.5. Chez les végétaux, il est maintenant évident que des modulations de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  jouent un rôle déterminant dans différents processus physiologiques, dont la modulation de l'ouverture et de la fermeture des stomates constitue un exemple unique et très bien caractérisé (Blatt, 2000; Yang *et al.*, 2004). La signalisation par le  $\text{Ca}^{2+}$  est aussi impliquée entre autres dans le gravitropisme, la division et l'élongation cellulaire, la différenciation, la polarité, les RD et les réponses aux stress, sans oublier la PCD. Les revues récentes de White et Broadley, 2003 et de Reddy, 2001 dressent un excellent portrait de toutes les études ayant porté sur la modulation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  au cours de processus développementaux ou en réponse à des stress biotiques et abiotiques (voir entre autres le tableau II de Reddy, 2001). De notre côté, nous nous attarderons plus spécifiquement à l'implication des flux de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cadre de la PCD.

#### 1.4.2.3.1 Généralités

Dans la cellule végétale, le  $\text{Ca}^{2+}$  est entreposé principalement dans l'apoplaste (1-10 mM), la vacuole (1-10 mM), le RE (1 mM) et les mitochondries (1 mM), alors qu'il est maintenu

aux environs de 100-200 nM dans le cytosol (Reddy, 2001). L'élévation de la  $[Ca^{2+}]_c$  peut donc se jouer de différentes façons, comme le laisse présager la présence de pompes à  $Ca^{2+}$  et de canaux perméables au  $Ca^{2+}$  au niveau de la membrane plasmique et des membranes internes (au même titre que chez les animaux; voir section 1.3.5). Un résumé de la distribution des rôles est présenté à la Figure 1-14. Il est à noter que le noyau peut aussi contribuer à la génération de signaux calciques (Pauly *et al.*, 2000; Pauly *et al.*, 2001). Le cas des mitochondries, dont il n'est pas question ici, sera discuté à la section 1.4.2.4.

La quantification de la  $[Ca^{2+}]_c$  peut se faire à l'aide de différents indicateurs qui peuvent être détectés en microscopie à fluorescence, habituellement avec un équipement spécialisé. Cependant, leur utilisation dans des cellules végétales a été très limitée, entre autres dû au fait qu'elles sont imperméables à plusieurs d'entre eux et que leur localisation intracellulaire demeure incertaine. C'est ainsi que la grande majorité des études ont été effectuées avec la technologie de l'aequorine basée sur la bioluminescence. En effet, la protéine peut être facilement exprimée dans les cellules végétales puis reconstituée *in vivo* en une enzyme fonctionnelle en présence d'oxygène et d'un groupement prosthétique, la coelentérazine. La liaison de  $Ca^{2+}$  entraîne alors un changement de conformation qui transforme la protéine en oxygénase active, et la coelentérazine est transformée en coelentéramide qui émet une lumière bleue ( $\lambda = 469$  nm) détectable facilement à l'aide d'un luminomètre (voir Roos, 2000; Mithöfer et Mazars, 2002).



**Figure 1-14 :** Représentation schématique des sentiers majeurs de transport du  $\text{Ca}^{2+}$  ayant été identifiés chez *A. thaliana*.

Les cercles bleus représentent des sentiers de transport actif [pompes à  $\text{Ca}^{2+}$  dépendant d'une source d'énergie; ACA : *autoinhibited*  $\text{Ca}^{2+}$ /ATPase (la direction vers laquelle le  $\text{Ca}^{2+}$  est pompé par ACA1 au niveau des chloroplastes est hypothétique) ECA1 : *ER-type*  $\text{Ca}^{2+}$ /ATPase; CAX1 :  $\text{Ca}^{2+}$ / $\text{H}^+$  antiporteur]. Les carrés rouges représentent des canaux perméables au  $\text{Ca}^{2+}$ , et ce de façon sélective (InsP<sub>3</sub>R : récepteur activé par l'inositol (1,4,5) triphosphate (InsP<sub>3</sub>); RyR : *ryanodine receptor* activé par l'ADP ribose cyclique (cADPR); DAC : *depolarization activated*  $\text{Ca}^{2+}$  channel; HAC : *hyperpolarization activated*  $\text{Ca}^{2+}$  channel; VVCa : *vacuolar voltage-gated*  $\text{Ca}^{2+}$  channel; SV : *slowly activating vacuolar channel*) ou non sélective (NSC : *non selective cation channel*; CNGCx : *cyclic nucleotide gated channel*; GLRx : *glutamate receptor channel*; TPC1 : *two-pore channel*). La localisation de ces canaux et pompes est parfois putative (entre autres pour ceux identifiés par la présence d'un ?) et ils n'ont pas tous été clonés (certains n'ont été caractérisés qu'au niveau électrophysiologique ou biochimique, notamment parmi ceux localisés aux organelles). Schéma tiré de Sanders *et al.* (2002).

Dans la plupart des cas répertoriés, l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol provient de l'apoplaste, mais dans certains cas une deuxième « vague » en provenance des compartiments internes a pu être détectée. De plus, l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol est habituellement transitoire ou plus ou moins soutenue pendant un certain temps (Rudd et Franklin-Tong, 2001) et peut aussi générer des oscillations (répétitions successives d'augmentations et de diminutions) comme c'est le cas dans les cellules de gardes (Blatt, 2000; Yang *et al.*, 2004). Ainsi, il a été établi que différents stimuli pouvaient générer des modulations spatiales et temporelles de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  reconnues comme étant leur  $\text{Ca}^{2+}$ -*signatures*, ces signatures devant être responsables au moins en partie de la spécificité de la réponse (Rudd et Franklin-Tong, 2001). Une signature particulière devrait donc générer une réponse particulière. Or, les preuves expérimentales pour appuyer ce postulat sont plutôt faibles, n'étant apparemment vraiment solides que dans le cas des cellules de gardes (Scrase-Field et Knight, 2003). Une autre hypothèse stipule que l'augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  n'agirait qu'en tant que  $\text{Ca}^{2+}$  *switch*, simplement en activant des éléments de transduction de signal sensibles au  $\text{Ca}^{2+}$  (dont il sera question au paragraphe suivant). La spécificité de la réponse pourrait alors dépendre de la présence ou non de tels éléments dans une cellule donnée (Scrase-Field et Knight, 2003).

Suivant un stimulus ou un stress, l'élévation transitoire de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  qui en découle est perçue et décodée par une gamme de protéines qui lient le  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}$ -*sensors*; CS) *via* un motif protéique spécifique (*EF hand*), alors que la sortie du  $\text{Ca}^{2+}$  vers l'extérieur ou sa séquestration par des organites tels que les vacuoles, le RE et les mitochondries permet le rétablissement de son niveau de base. La liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  à une CS donnée entraîne un changement de conformation chez cette dernière qui résulte en la modulation de son activité (souvent des protéine kinases  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendantes) ou de sa capacité à interagir et moduler l'activité de d'autres protéines, comme la calmoduline (CaM), un récepteur de  $\text{Ca}^{2+}$  ubiquitaire chez les eucaryotes (Snedden et Fromm, 2001). Les CaM, présentes sous de nombreuses isoformes dans le règne végétal, modulent ainsi l'activité d'un grand nombre de *CaM-binding proteins* (CBP). Ces CBP sont impliquées dans une large gamme de processus tels que le transport d'ions (plusieurs codent pour des canaux ioniques), la régulation des gènes, l'organisation du cytosquelette, la division cellulaire, la résistance aux

maladies et la tolérance aux stress. Il est probable que certaines CBP aient des fonctions spécifiques aux plantes puisque plusieurs n'ont pas d'homologue animal (Reddy, 2001).

#### 1.4.2.3.2 $\text{Ca}^{2+}$ , ROS et PCD végétale

Dans la PCD végétale, une élévation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  est observée durant la différenciation des TE, la formation de l'aérenchyme, la maturation de l'endosperme, la sénescence foliaire, la HR et la réaction de SI (dans les grains de pollen). Une telle réponse accompagne également la signalisation hormonale. Dans plusieurs des cas, l'inhibition de l'augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  inhibe la réponse physiologique, établissant l'importance du  $\text{Ca}^{2+}$  dans la transduction de signal menant à la PCD. Tenter ici d'en dresser un portrait exhaustif serait non seulement long et fastidieux mais également ennuyeux. Nous tenterons plutôt d'examiner les mécanismes cellulaires menant à l'augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , ou les événements en aval sous-tendus par cette augmentation.

Parmi les événements conduisant à la PCD qui sont régulés par une hausse de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , notons la production de ROS par la NADPH oxydase. En effet, des plantes transgéniques dont l'activité catalase est réduite accumulent plus de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en présence d'une intense lumière, ce qui conduit à une PCD massive dont les symptômes sont similaires à la PCD induite par l'ozone (Dat *et al.*, 2003). Dans ces conditions, l'induction du messenger codant pour la NADPH oxydase et l'inhibition de la PCD par des inhibiteurs de l'*oxydative burst* laisse présager que la génération d'une bouffée de ROS par la NADPH oxydase est nécessaire pour l'induction de la PCD, un phénomène aussi observé dans la HR. De plus, un flux de  $\text{Ca}^{2+}$  de l'apoplaste vers le cytosol est aussi important pour l'induction de cette PCD, comme c'est le cas pour l'induction de la HR (McDowell et Dangl, 2000). Il semblerait que le flux de  $\text{Ca}^{2+}$  puisse être à l'origine de la génération de l'*oxydative burst* par la NADPH oxydase, cette dernière possédant justement deux motifs *EF hand* qui permettent la liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  (Keller *et al.*, 1998). Il semble que les *calmodulin-like domain protein kinases* (CDPK), une superfamille de protéines uniques aux plantes et dont plusieurs sont induites au cours des RD, pourraient aussi induire l'activité de la NADPH oxydase en présence de niveaux élevés de  $\text{Ca}^{2+}_c$  (Blumwald *et al.*, 1998).

L'induction de la PCD de type HR par la cryptogéine dans des cultures cellulaires de tabac est un modèle bien caractérisé (voir entre autres Lecourieux *et al.*, 2002). La cryptogéine est une élicitrine qui origine de l'oomyète *Phytophthora cryptogea* dont l'interaction avec un récepteur localisé au niveau de la membrane plasmique (Wendehenne *et al.*, 1995; Bourque *et al.*, 1998; Bourque *et al.*, 1999) entraîne rapidement la phosphorylation d'une variété de protéines (Lecourieux-Ouaked *et al.*, 2000) puis un influx de  $\text{Ca}^{2+}$  de l'apoplaste vers le cytosol (Tavernier *et al.*, 1995). Ces deux événements sont nécessaires pour l'activation de MAPK (Lebrun-Garcia *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2000), la mobilisation de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire menant à une deuxième vague d'augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  (Lecourieux *et al.*, 2002), la production transitoire de ROS par la NADPH oxydase (Pugin *et al.*, 1997) et l'ouverture de canaux anioniques au niveau de la membrane plasmique (Wendehenne *et al.*, 2002). De plus, cette élicitrine peut stimuler la production de NO, un événement dépendant lui aussi de l'influx initial de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol. Ce NO favorise la sortie de  $\text{Ca}^{2+}$  à partir des compartiments internes, mais n'a apparemment rien à voir avec l'activation des MAPK, l'ouverture des canaux anioniques ou l'accumulation de messagers codant pour des protéines de défense (Lamotte *et al.*, 2004). Combinées à d'autres travaux récents, comme ceux de Wendehenne *et al.*, (2004), ces données indiquent que le  $\text{Ca}^{2+}$  est impliqué dans la signalisation par le NO.

Le passage du  $\text{Ca}^{2+}$  de l'apoplaste vers le cytosol si souvent observé au cours de la PCD végétale doit nécessairement se faire *via* des canaux ioniques (section 1.4.2.3.1). Le gène codant pour *dnd1* (*CNGC2*), un mutant d'*A. thaliana* isolé à cause de son incapacité à induire la HR en présence d'un pathogène avirulent, est en fait un *cyclic nucleotide-gated channel* (CNGC) permettant le passage du  $\text{Ca}^{2+}$ , du  $\text{K}^+$  et d'autres cations en présence de nucléotides cycliques (Leng *et al.*, 1999; Clough *et al.*, 2000). De plus, son expression est associée avec certaines formes de PCD développementale, notamment la sénescence florale et foliaire et la sénescence dans des cultures cellulaires (Köhler *et al.*, 2001). Fait intéressant, l'ajout de dibutyryl AMPc ou GMPc (des dérivés actifs lipophiles des nucléotides cycliques pouvant traverser les barrières lipidiques) à des protoplastes de tabac favorise l'augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  (Volotovski *et al.*, 1998). De ce fait, l'augmentation d'AMPc induite par un éliciteur fongique dans des suspensions cellulaires de haricot (Bolwell, 1992) pourrait être responsable de l'augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  et de la

production de ROS qui en découlent (Bindschedler *et al.*, 2001). Il est également possible que le gène *PPF1* code pour un transporteur de  $\text{Ca}^{2+}$  localisé au niveau des chloroplastes. Puisque sa surexpression retarde la PCD du méristème apical, conjointement avec le retardement de la détection d'une augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  (tous deux étant au contraire accélérés lorsque l'expression de la protéine est inhibée par l'expression de l'ARNm dans l'orientation antisens), il a été proposé que *PPF1* code pour un canal ionique pouvant inhiber la PCD en maintenant un faible niveau de  $\text{Ca}^{2+}_c$  (Wang *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004).

Finalement, le cas de la SI dans les tubes polliniques en germination (voir section 1.4.1.3) fournit un bel exemple de PCD développementale impliquant la signalisation par le  $\text{Ca}^{2+}$ . En effet, une augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  (parvenant au moins en partie de l'extérieur du tube pollinique) est à l'origine de l'inactivation quasi immédiate (en moins de 90 secondes) par phosphorylation d'une pyrophosphatase, puis à peine quelques minutes plus tard une autre activité de phosphorylation mènerait à l'activation d'une MAPK putative (Rudd et Franklin-Tong, 2003). La SI mène aussi, outre la fragmentation de l'ADN déjà discutée dans une autre section, au clivage de la poly (ADP-ribose) polymérase (PARP) d'origine bovine (Thomas et Franklin-Tong, 2004), une enzyme impliquée dans la réparation de l'ADN nucléaire et constituant un substrat classique de la caspase-3 dans l'apoptose animale (Degterev *et al.*, 2003). Le clivage d'une PARP végétale putative a déjà été rapporté dans le cadre de la PCD végétale en utilisant des anticorps dirigés contre une PARP animale (Sun *et al.*, 1999; Tian *et al.*, 2000) et les plantes possèdent au moins deux gènes codant potentiellement pour cette enzyme (Lepiniec *et al.*, 1995; Babiychuk *et al.*, 1998). D'autre part, l'utilisation d'un inhibiteur spécifique pour la caspase-3 animale a permis de réduire considérablement le clivage de l'ADN associé à la SI, ainsi que de réduire l'inhibition de l'élongation du tube pollinique et le clivage de la PARP, suggérant l'activation d'une activité caspase-like en réponse à la SI (Thomas et Franklin-Tong, 2004; voir aussi la section 1.4.3). Finalement, l'élévation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  dans les tubes polliniques incompatibles est associée à la sortie du cytc des mitochondries (Thomas et Franklin-Tong, 2004), dont il sera question à la section suivante.

#### 1.4.2.4 Mitochondries et RE

Chez les mammifères, il est maintenant reconnu que l'effet tampon que peuvent exercer les mitochondries vis-à-vis l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_c$  qui survient à la suite d'un stimulus ou d'un stress donné contribue à en moduler le patron spatio-temporel. Cependant, cette accumulation de  $Ca^{2+}_m$  peut éventuellement dépasser la capacité tampon des mitochondries. Ceci entraîne alors l'ouverture d'un pore (accompagné ou non de la rupture de la membrane mitochondriale externe) et la sortie de certaines molécules cytotoxiques telles que le cytc, l'AIF et l'endonucléase G, ces deux dernières contribuant aux dommages à l'ADN nucléaire de façon indépendante des caspases (voir section 1.3.4). Chez les végétaux, des preuves directes de l'existence d'un tel mécanisme d'induction de la PCD sont absentes, mais certains résultats indirects portent à croire que les plantes pourraient être pourvues d'un tel mécanisme.

Similairement à ce qui est observé chez les animaux (voir section 1.3.5.2), les mitochondries végétales peuvent être sujettes à des fluctuations de  $[Ca^{2+}]_m$ , détectées en utilisant certains stress connus pour induire des élévations au niveau du  $Ca^{2+}_c$  (Logan et Knight, 2003). La plupart des stress ayant été testés, soit le mannitol, le froid et le contact (*touch*), induisent une élévation transitoire de la  $[Ca^{2+}]_m$  plus faible que l'élévation observable dans le cytosol, alors que dans le cas du  $H_2O_2$ , l'élévation est tout aussi forte et soutenue que l'élévation cytosolique (Logan et Knight, 2003). Fait intéressant, le  $H_2O_2$  est justement le plus susceptible des stress testés à conduire à la PCD. D'ailleurs, la sortie du cytc des mitochondries vers le cytosol a été rapportée dernièrement chez des plantes accumulant plus de  $H_2O_2$  dû à une faible activité catalase (Dat *et al.*, 2003) ou dans des cultures cellulaires exposées à une source de  $H_2O_2$  et générant ainsi un stress oxydatif constant (Tiwari *et al.*, 2002). En fait, la sortie du cytc des mitochondries vers le cytosol dans diverses situations de PCD végétale a été rapportée par plusieurs équipes au cours des dernières années (Balk *et al.*, 1999; Stein et Hansen, 1999; Sun *et al.*, 1999; Hansen, 2000; Xie et Chen, 2000; Balk et Leaver, 2001; Chiandussi *et al.*, 2002; Curtis et Wolpert, 2002; Robson et Vanlerberghe, 2002; Virolainen *et al.*, 2002; Yao *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002; Carimi *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2003; Pasqualini *et al.*, 2003; Krause et Durner, 2004; Thomas et Franklin-Tong, 2004; Yao *et al.*, 2004; Zuppin *et al.*, 2004). Cependant, cette

sortie n'a pas pu être observée dans le cas de la sénescence des pétales de pétunia (Xu et Hanson, 2000) ou de la PCD induite par un apport exogène de protoporphyrine IX à des protoplastes d'*Arabidopsis* (Yao *et al.*, 2004), de sorte que l'importance de cet événement dans l'induction de la PCD végétale est encore l'objet de débats.

Bien que la plupart de ces études ayant vérifié la sortie du *cytc* des mitochondries ont pu démontrer qu'il s'agissait d'un événement précoce dans le cours de la PCD (mais pas toutes; voir entre autres Yao *et al.*, 2004), un effet direct sur d'autres événements en aval n'a habituellement pas été testé. De même, l'implication du  $\text{Ca}^{2+}$  dans cette sortie n'est que spéculative. Quelques études font cependant exception. En effet, dans le cas de la SI chez le pollen, la sortie du *cytc* débute quelques minutes à peine après le contact entre le pollen et la protéine incompatible du stigma, et se poursuit pour atteindre une sortie maximale entre 60 et 120 minutes après le contact (Thomas et Franklin-Tong, 2004). L'induction de la sortie du  $\text{Ca}^{2+}$  du RE par le mastoparan (qui stimule la production d' $\text{IP}_3$ ) induirait le même effet, atteignant un maximum en 5 minutes. Le mastoparan stimule aussi le clivage de la PARP et l'inhibition de l'influx initial de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol inhibe considérablement le clivage (Thomas et Franklin-Tong, 2004). Malheureusement, l'effet de l'inhibition de l'influx initial de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol sur la sortie du *cytc* n'a pas été rapporté, mais l'ensemble des données indique clairement un rôle pour le  $\text{Ca}^{2+}$  dans ce type de PCD.

L'autre étude ayant spécifiquement tenté d'établir un lien entre l'augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , la sortie du *cytc* et l'induction de la PCD a pris pour modèle un autre cas de PCD développementale, soit la différenciation des TE (Yu *et al.*, 2002). En effet, dans ce modèle, l'exécution de la PCD à l'étape de la désintégration de la vacuole nécessite un influx de  $\text{Ca}^{2+}$  (Groover et Jones, 1999). La sortie du *cytc* et d'autres modifications des propriétés des mitochondries, telles que des changements ultrastructuraux au niveau de l'organisation de la membrane interne et sa dépolarisation [dissipation de la différence de potentiel membranaire mitochondrial ( $\Delta\psi_m$ )], précèdent la rupture de la vacuole et il est plausible que ces événements conduisent à la PCD (Yu *et al.*, 2002). Cependant, l'induction artificielle de la sortie du *cytc* par l'acide bétulinique, qui provoque la dissipation du  $\Delta\psi_m$  et conséquemment la PCD, n'a pu être inhibée par l'action de la cyclosporine A, qui bloque l'action de l'acide bétulinique en empêchant la formation du PTP, et ce malgré l'inhibition

de la PCD. Il a donc été conclu que les mitochondries sont impliquées dans la PCD des TE, mais que la sortie du *cytc* est insuffisante pour induire la PCD dans ces cellules (Yu *et al.*, 2002). Cette conclusion va dans le même sens que celle résultant de l'étude de Yao et collaborateurs (2004), où des protoplastes d'*A. thaliana* ont été utilisés pour tester trois inducteurs différents de la PCD. Une dissipation du  $\Delta\psi_m$  a été observée dans tous les cas, alors qu'un seul des trois inducteurs a conduit à la sortie du *cytc*.

Plusieurs autres études ont également évalué la possibilité de la dissipation du  $\Delta\psi_m$  ou l'ouverture du PTP au cours de la PCD végétale, en corrélation ou non avec la sortie du *cytc* (Curtis et Wolpert, 2002; Maxwell *et al.*, 2002; Saviani *et al.*, 2002; Curtis et Wolpert, 2004; Krause et Durner, 2004; Yao *et al.*, 2004). Dans la plupart des cas, une relation de cause à effet a pu être établie entre l'altération de l'intégrité mitochondriale et l'occurrence de la PCD ou certains événements y étant associés. Par exemple, Maxwell et collaborateurs (2002) ont identifié un certain nombre de gènes (dont celui codant pour l'AOX) étant rapidement induits suite au traitement de cultures cellulaires de tabac avec l'antimycine A (AA), un inhibiteur de la chaîne de transport des électrons (et conséquemment inducteur de la PCD). Or, ces gènes sont aussi induits par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et l'AS, qui similairement à l'AA, affectent les fonctions mitochondriales telles que la respiration et la production d'ATP. Considérant que le prétraitement des cellules avec un autre inhibiteur du PTP, l'acide bongkrelique, bloque complètement l'induction des gènes candidats, il est probable que l'ouverture du PTP mitochondrial soit impliquée dans la transduction de signal par ces inducteurs de la PCD.

Fait intéressant, des mutants présentant une stérilité mâle, i.e. ne produisant pas de pollen viable, présentent en fait une PCD prématurée du tapetum (voir section 1.4.1.2), associée à une intense vacuolisation du cytoplasme (Balk et Leaver, 2001; Ku *et al.*, 2003). Plusieurs de ces mutants (*cytoplasmic male sterility*) résultent d'un réarrangement de l'ADN mitochondrial créant un nouveau gène qui code pour une petite protéine de 13 kDa (UFR13), qui entraînerait un mal fonctionnement mitochondrial *via* la formation de pores. Les cellules du tapetum seraient particulièrement sensibles à cette mutation due à la demande énergétique extraordinaire requise pour les premières étapes de la formation du pollen. En effet, le nombre de mitochondries dans les cellules du tapetum et du tissu

sporogène augmente de 20 à 40 fois chez le maïs (revu par Wu et Cheung, 2000). Or, la sortie du cytc des mitochondries vers le cytosol précède les changements morphologiques associés à cette PCD ainsi que la perte de l'intégrité de la MME et les fonctions respiratoires (Balk et Leaver, 2001).

Notons également l'existence d'homologues végétaux du VDAC (un autre candidat potentiel pour le passage du cytc à travers la MME), dont un homologue d'*A. thaliana* qui est rapidement induit au cours de la HR (Lacomme et Roby, 1999). Similairement, le VDAC est induit au niveau protéique (mais pas au niveau du messenger) dans le cours de la sénescence naturelle ou de la PCD déclenchée par un choc thermique dans des suspensions d'*A. thaliana* (Swidzinski *et al.*, 2002; Swidzinski *et al.*, 2004). De plus, un homologue du VDAC isolé du riz est capable d'induire l'apoptose lorsque surexprimé dans des cellules animales et cette mort peut être partiellement bloquée par la co-expression de Bcl-2 ou par un inhibiteur du VDAC (Godbole *et al.*, 2003). Ces auteurs ont également rapporté que ce même inhibiteur ainsi que la cyclosporine A, qui bloque la formation du PTP, ont permis d'inhiber la PCD induite par un stress thermique dans des cotylédons de concombre (Godbole *et al.*, 2003). La régulation transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle du VDAC au cours de différents types de PCD suggère donc un rôle ubiquitaire de cette protéine dans la PCD végétale.

Bien que beaucoup d'études aient analysé les variations de la  $[Ca^{2+}]_c$  chez les végétaux en réponse à différents stimuli, la plupart d'entre elles ont détecté des influx de  $Ca^{2+}$  en provenance de l'apoplaste et nous ne connaissons pas grand-chose de la contribution possible et probable des compartiments internes aux modulations du  $Ca^{2+}_c$ , à l'exception de la contribution de la vacuole (Allen *et al.*, 1995). Connaissant le rôle important que peut jouer le RE dans l'apoptose animale, il serait d'autant plus pertinent d'investiguer davantage de ce côté chez les végétaux, surtout considérant certaines évidences (dont nous venons de discuter) suggérant que le  $Ca^{2+}$  peut perturber l'homéostasie mitochondriale chez les végétaux (voir entre autres Thomas et Franklin-Tong, 2004) et que l'inhibition du PTP inhibe ou diminue la PCD. Fait intéressant, l'inhibition de la pompe  $Ca^{2+}$ /ATPase du RE par l'acide cyclopiazonique dans des suspensions cellulaires de soya entraîne une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_c$  et la PCD (Zuppini *et al.*, 2004). Malheureusement, l'analyse

d'un effet potentiel sur les mitochondries a été restreinte à l'évaluation de la sortie du *cytc*, et ce après 24 h, ce qui est beaucoup trop tard pour évaluer le rôle potentiel du *cytc* dans ce type de PCD.

Par ailleurs, l'étude des flux de  $\text{Ca}^{2+}$  générés par des stress osmotiques chez l'algue marine *Fucus serratus* a aussi fourni des informations fort intéressantes sur la participation du RE dans la signalisation par le  $\text{Ca}^{2+}$  (voir la revue de Ng et McAinsh, 2003). En effet, suite à un stress hypoosmotique, une vague de  $\text{Ca}^{2+}$  est dérivée des compartiments internes et provient spécifiquement du RE, ce qui est incontestable considérant que les cellules utilisées pour l'études sont dépourvues de vacuoles (embryons au stade de deux cellules; Goddard *et al.*, 2000). D'autre part, un stress hyperosmotique dans ces même cellules génère d'abord un influx de  $\text{Ca}^{2+}$  vers le cytosol en provenance de l'apoplaste et la production de  $\text{H}_2\text{O}_2$  dans l'apoplaste est nécessaire à cet influx (Coelho *et al.*, 2002). À ce sujet, il a d'ailleurs été démontré que la génération de ROS dans l'apoplaste par la NADPH oxydase peut entraîner l'ouverture de canaux à  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau de la membrane plasmique (plus particulièrement des *non selective cation channels*; Foreman *et al.*, 2003). Une seconde vague de ROS est ensuite générée au niveau intracellulaire, plus spécifiquement à partir des mitochondries, et dépend de l'augmentation initiale de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ . Bien que l'intégrité des mitochondries n'ait pas été évaluée (de toute façon on ne parle pas ici d'un stress conduisant à la PCD), celles-ci accumulent du  $\text{Ca}^{2+}$  et la sortie de  $\text{Ca}^{2+}$  du RE stimulée artificiellement par l' $\text{IP}_3$  est suffisante pour entraîner la production de ROS par les mitochondries (Coelho *et al.*, 2002). Il est donc probable que suite à l'augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , l'accumulation de  $\text{Ca}^{2+}$  par les mitochondries conduise à la production de ROS, mais il n'est pas clair si une seconde vague de  $\text{Ca}^{2+}$  généré par le RE est impliquée ou si le  $\text{Ca}^{2+}$  ne provient que de l'apoplaste.

L'ensemble de ces données constitue donc un plaidoyer convainquant en faveur de l'implication chez les végétaux des mitochondries dans la signalisation par le  $\text{Ca}^{2+}$ , y compris l'induction de la PCD. Il semble effectivement que similairement aux animaux, la dissipation du  $\Delta\psi_m$  via l'ouverture d'un PTP puisse être impliquée, et l'accumulation de  $\text{Ca}^{2+}$  pourrait aussi être impliquée dans certains cas. En combinant ces données à la présence d'activités nucléases dans l'espace intermembranaire mitochondrial pouvant générer des fragments internucléosomiaux de l'ADN nucléaire (voir section 1.4.3.3), nous

obtenons alors un portrait ressemblant de plus en plus à la PCD animale. Mais une question demeure cependant : y a-t-il des caspases végétales?

### 1.4.3 Exécution

#### 1.4.3.1 Protéases

Chez les végétaux comme chez les animaux, le démantèlement cellulaire associé à la PCD fait appel à des enzymes hydrolytiques telles que des protéases et des nucléases. Alors que chez les animaux, les fonctions protéolytiques sont en grande partie (mais pas exclusivement) attribuées aux caspases, dont les membres peuvent avoir des fonctions de régulation et d'exécution, les génomes végétaux n'en ont révélé aucun homologue de séquence, bien que cela n'exclue pas la présence d'homologues de fonction. En effet, on ne compte plus le nombre de publications ayant rapporté la détection d'activités *caspase-like* (en utilisant des substrats synthétiques des caspases animales) ou l'inhibition partielle jusqu'à quasi complète de la PCD en utilisant des inhibiteurs de caspases (voir les revues de Lam et del Pozo, 2000; van der Hoorn et Jones, 2004). Bien que ces données doivent être interprétées avec précaution dû à une non-spécificité potentielle (entre autres les inhibiteurs généralement utilisés peuvent inhiber des cystéine protéases de type papaïne; van der Hoorn et Jones, 2004), il n'en demeure pas moins qu'elles peuvent être révélatrices de la présence de certains homologues fonctionnels. Certains travaux récents ont notamment permis quelques avancées fort intéressantes à ce sujet, dont nous traiterons dans cette section.

Notons d'abord que les végétaux contiennent dans leurs génomes des centaines de gènes codant pour des protéases (au moins 488 chez *Arabidopsis*), celles-ci étant subdivisées en fonction de leur spécificité catalytique. On retrouve donc des sérine, aspartique, cystéine, metallo et thréonine protéases (van der Hoorn et Jones, 2004). De façon générale, ce sont surtout les sérine et cystéine protéases qui sont associées à la PCD végétale (Lam et del Pozo, 2000). Cependant, la majorité des études ont analysé soit la modulation de l'accumulation d'ARNm codant pour des protéases au cours des différentes étapes de la

PCD, soit l'évolution d'activités *caspase-like* dans des extraits protéiques plus ou moins purifiés, soit l'inhibition de la PCD par des inhibiteurs de caspases. Dans les deux derniers cas, l'identité de la ou des protéases impliquées est complètement inconnue, et dans le premier cas, seule l'accumulation de l'ARNm (et non de la protéine) est connue, ignorant tout de sa véritable activité protéolytique.

Malgré tout, quelques études ayant fait appel à des inhibiteurs de caspases moins conventionnels méritent d'être mentionnées. D'abord, deux études ayant utilisé un inhibiteur naturel des caspases, la protéine p35 du baculovirus, ont démontré d'une part que cette protéine inhibe la PCD de type HR induite par le virus de la mosaïque du tabac (TMV) ou une mycotoxine, ce qui n'était pas possible avec des mutants de la protéine connus pour être non-fonctionnels, et d'autre part confère une résistance à large spectre envers différents pathogènes (del Pozo et Lam, 2003; Lincoln *et al.*, 2002). Cet inhibiteur présente un intérêt particulier puisqu'il inhibe pratiquement toutes les caspases animales mais n'interagit pas avec d'autres protéases comme les papaïnes. De même, une protéine de virulence de la bactérie pathogène *Agrobacterium tumefaciens*, VirD2, possède 2 sites pouvant être spécifiquement clivés par la caspase-3 humaine. Or, le clivage à l'un des deux sites a pu être détecté assez tôt dans le cours de la HR induite par le TMV chez le tabac et l'identification de ce site a conduit au développement d'un inhibiteur spécifique qui retarde la HR *in vivo* (Chichkova *et al.*, 2004). La protéase responsable de l'activité *caspase-like* à partir de ce substrat n'a cependant pas encore été identifiée.

D'autres études ont toutefois mené à une caractérisation plus poussée des enzymes responsables des activités protéolytiques détectées dans le cours de la PCD. Par exemple, une cystéine endopeptidase (CysEP) est retrouvée dans un organite spécial, le ricinosome (initialement identifié chez *Ricinus communis* L., appelé ricin ou *castor bean*), qui s'accumule dans l'endosperme entourant les cotylédons chez les plantes dicotylédones au cours de la germination (voir la revue de Gietl et Schmid, 2001). En effet, chez le ricin, l'endosperme est encore vivant dans la graine et ses réserves (relativement faibles comparées à celles des énormes cotylédons de l'embryon) sont mobilisées dans les premiers jours de la germination au profit de l'embryon. La CysEP s'accumule dans le ricinosome sous une forme inactive nécessitant le clivage d'un domaine en N-terminal pour

son activation, rappelant étrangement le cas des caspases animales (voir section 1.3.2). L'activation de l'enzyme se fait possiblement par autocatalyse en conditions acides et la désintégration des ricinosomes coïncide avec la phase de fragmentation de l'ADN. Grâce à une spécificité de substrat assez large, la CysEP contribuerait au recyclage du contenu cytoplasmique au profit de l'embryon dans les dernières phases de la PCD (Than *et al.*, 2004).

D'autre part, une cystéine protéase appartenant au sous-groupe des *vacuolar processing enzymes* (VPE) a été originellement identifiée à cause de son implication dans la maturation des protéines d'entreposage retrouvées dans les graines. Cependant, cette enzyme est également particulièrement abondante dans les feuilles en sénescence, est induite par des blessures, l'AS et pendant la HR induite par le TMV (van der Hoorn et Jones, 2004; Hatsugai *et al.*, 2004). De plus, bien que ne présentant pas d'homologie de séquence avec les caspases, le site actif des VPE et probablement le repliement protéique ressemblent à ceux des caspases (van der Hoorn et Jones, 2004). Une VPE présentant une activité caspase-1 s'est aussi avérée essentielle à l'exécution de la HR induite par le TMV (Hatsugai *et al.*, 2004). Deux autres protéases possédant des activités *caspase-like* et impliquées dans la PCD induite par la victorine, une toxine fongique, ont été purifiées et caractérisées du point de vue de leur activité catalytique. Fait intéressant, les enzymes purifiées sont en fait des sérine protéases, probablement impliquées dans une cascade de signalisation impliquant d'autres protéases (Coffeen et Wolpert, 2004).

### 1.4.3.2 Métacaspases

Finalement, les métacaspases et les paracaspases sont deux familles distinctes de cystéines protéases apparentées aux caspases (*caspases-like*) ayant été identifiées il y a quelques années à peine par des analyses informatiques à travers les génomes de différents règnes (Uren *et al.*, 2000). Les paracaspases ont été identifiées chez les animaux et *Dictyostelium*, alors que les métacaspases, apparemment exclues du règne animal, ont été trouvées chez les végétaux, les champignons et les protozoaires. Les métacaspases sont donc considérées par plusieurs comme des candidats potentiels à l'exécution de la PCD chez les végétaux. Leur homologie avec les caspases animales n'est pas restreinte à une certaine identité de

séquence du domaine catalytique, mais s'étend aussi à la structure secondaire (principalement le repliement caspase-hémoglobine; Uren *et al.*, 2000). La métacaspase retrouvée chez *S. cerevisiae*, nommée YCA1, est impliquée chez cet organisme dans la PCD induite par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, l'acide acétique, le vieillissement (Madeo *et al.*, 2002) et l'absence d'une enzyme de désubiquitination (Bettiga *et al.*, 2004). De plus, la protéine possède non seulement des homologues de structure avec les caspases animales mais aussi certaines homologues de fonction, étant dotée d'une spécificité de substrat similaire aux caspases initiateuses. Une autre métacaspase présente chez le protozoaire *Trypanosoma brucei* cause une inhibition de la croissance, des dysfonctions mitochondriales et la mort lorsque surexprimée chez la levure (Szallies *et al.*, 2002).

Chez les végétaux, les métacaspases peuvent être subdivisées en deux catégories : le type I (trois gènes chez *Arabidopsis*), contenant un pro-domaine putatif en N-terminal, et le type II (six gènes chez *Arabidopsis*), ne contenant apparemment pas de pro-domaine mais plutôt une extension d'environ 180 acides aminés en C-terminal entre les sous-unités putative p20 et p10 (Uren *et al.*, 2000; Watanabe et Lam, 2004; Vercammen *et al.*, 2004). Il est intrigant que plusieurs métacaspases de type I possèdent aussi dans leur pro-domaine des motifs doigt de zinc ressemblant à ceux de la protéine LSD1, un inhibiteur de la HR agissant possiblement comme facteur de transcription (Uren *et al.*, 2000; Dietrich *et al.*, 1997).

Certains travaux récents ont démontré pour la première fois l'implication d'une activité *caspase-like* d'une métacaspase dans la PCD développementale chez les végétaux (gymnospermes). En effet, une activité *caspase-like* détectée très tôt durant l'embryogenèse chez l'épinette de Norvège a la même spécificité de substrat que la métacaspase YCA1 de la levure et son inhibition compromet la formation de l'embryon (Bozhkov *et al.*, 2004). La même équipe a cloné un gène correspondant à une métacaspase de type II dont l'accumulation du messager coïncide avec les tissus destinés à mourir (Suarez *et al.*, 2004). L'inhibition de l'expression de la protéine par interférence de l'ARN (*RNAi*) a permis de diminuer considérablement l'activité *caspase-like* détectée auparavant et d'abolir complètement la différenciation en embryon, démontrant la nécessité fondamentale de cette métacaspase végétale dans l'embryogenèse de l'épinette, et ce dès les premiers stades du développement (Suarez *et al.*, 2004). Chez les angiospermes, le niveau d'ARNm d'une

métacaspase de type II chez la tomate augmente au cours d'une infection par le champignon pathogène nécrotrophe *Botrytis cinerea*, mais pas au cours de la PCD induite par la camptothécine ou la fumonisine B1 dans des cultures cellulaires (Hoerberichts *et al.*, 2003). L'expression dans *E. coli* des gènes codant pour les métacaspases de type II d'*Arabidopsis* entraîne l'autoprotéolyse des protéines ainsi exprimées, similairement aux caspases animales, résultant en une petite et une grande sous-unités. Cependant, contrairement à la métacaspase caractérisée chez l'épinette de Norvège, les métacaspases 4 et 9 d'*Arabidopsis* ne clivent aucun des substrats spécifiques aux caspases (préférant des résidus arginine ou lysine), suggérant que les métacaspases de type II (à tout le moins les deux étudiées) ne sont pas directement responsables des activités *caspase-like* chez *Arabidopsis* (Vercammen *et al.*, 2004). L'ensemble de ces travaux démontre toutefois que les métacaspases peuvent non seulement avoir une activité protéolytique, mais aussi que dans certains cas leur spécificité peut être similaire à certaines caspases animales. Ces informations fort excitantes ouvrent la voie à la découverte de sentiers de signalisation et d'exécution par des protéases dans la PCD végétale.

### 1.4.3.3 Nucléases

En terminant, notons que la dégradation de l'ADN nucléaire observée dans la plupart des cas de PCD végétale (conduisant ou non à la fragmentation internucléosomale) implique nécessairement la participation de nucléases. Chez les végétaux, les endonucléases dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$  et du  $\text{Zn}^{2+}$  sont deux classes majeures de DNases, et beaucoup d'entre elles voient leur expression majorée lors de différents cas de PCD (voir la revue de Sugiyama *et al.*, 2000). Notamment, le gène *ZEN1* cloné chez *Zinnia* et codant pour une DNase dépendante du  $\text{Zn}^{2+}$  pourrait bien occuper un rôle central dans la fragmentation de l'ADN lors de la différenciation des TE (Ito et Fukuda, 2002). D'autre part, deux activités nucléases ont été détectées dans l'espace intermembranaire mitochondrial : l'une responsable du clivage de l'ADN nucléaire en gros fragments d'environ 30 kDa (en 3 h) et de la condensation de la chromatine (en 6 h), l'autre pouvant générer des fragments typiques de la dégradation internucléosomale mais en présence d'un facteur cytosolique seulement (en 12 h; Balk *et al.*, 2003). Cela rappelle évidemment les nucléases animales relâchées de l'espace intermembranaire, soit l'AIF et l'endonucléase G (voir section 1.3.4),

suggérant que certains mécanismes de régulation des nucléases impliquées dans la PCD sont similaires entre les animaux et les végétaux.

## 1.4.4 Régulateurs ? Le trou noir de la PCD végétale

### 1.4.4.1 Considérations générales

Chez les animaux, l'activation des caspases dépend d'une étroite surveillance par les membres de la famille Bcl-2, lesquels sont apparemment absents du règne végétal, y compris *S. cerevisiae* (Lam, 2004; Aravind *et al.*, 2001). Comme il semble de plus en plus évident que certaines protéases végétales, y compris des métacaspases ou d'autres protéases pourvues d'activité *caspase-like*, pourraient être la contrepartie végétale des caspases animales, peut-être devons-nous s'armer d'un peu plus de patience et fouiller plus attentivement les génomes végétaux pour y dénicher des homologues structuraux, à défaut d'homologues de séquences, des membres de la famille Bcl-2.

En attendant, nous sommes devant le constat que malgré l'évidence selon laquelle les plantes ont développé des stratégies qui leur sont propres afin de réguler le sort de leurs cellules, la plupart semblent spécifiques à un type particulier de PCD. Ainsi, l'étude la PCD de type HR a révélé bon nombre de régulateurs positifs ou négatifs, essentiellement *via* la caractérisation de mutants. Par exemple, les régulateurs négatifs LSD1 et MLO semblent conservés parmi les monocotylédones et les dicotylédones (Lam, 2004; Hoeberichts et Woltering, 2003; Lorrain *et al.*, 2003). Cependant, jusqu'à présent, aucun régulateur ne semble ubiquitaire à toutes les formes de PCD.

Mentionnons cependant le cas de l'une des familles de gènes R (qui sont impliqués dans la HR; voir section 1.4.1.8), nommée NB-LRR, qui code pour des protéines généralement cytoplasmiques composées d'un domaine de liaison de nucléotides (*nucleotide binding*; NB) et d'un domaine contenant des répétitions riches en leucine (*leucine-rich repeats*; LRR). Des motifs présents dans la région NB présentent des similarités avec Apaf-1, une protéine impliquée dans la formation de l'apoptosome chez les mammifères (voir section

1.3.4), et sa contrepartie chez *C. elegans*, CED-4 (Van der Biezen et Jones, 1998). Cette région est nommée domaine AP-ATPase et est aussi retrouvée chez plusieurs protéines putatives procaryotes (dont les fonctions sont inconnues), ce qui suggère une origine évolutive ancienne (Aravind *et al.*, 1999; Koonin et Aravind, 2002). La signification fonctionnelle de cette homologie n'est toujours pas claire, mais il se trouve que le génome d'*Arabidopsis* contient environ 150 séquences avec une homologie aux NB-LRR, dénotant l'importance potentielle de ce motif chez les végétaux. La famille des NB-LRR est divisée en deux classes selon leur extrémité N-terminale, dont l'une possède un domaine similaire aux domaines cytoplasmiques des récepteurs Toll et interleukine-1 (TIR) de la drosophile et des mammifères. Les TIR-NB-LRR ressemblent structurellement aux TLR (*Toll-like receptor*) impliqués dans l'immunité innée des mammifères et de la drosophile. La spécificité des produits des gènes *R* envers le produit d'un gène d'avirulence d'un pathogène donné semble venir du domaine LRR, dont les régions exposées (hydrophiles) sont hypervariables, rappelant encore le système immunitaire (Shirasu et Schulze-Lefert, 2000; Dangl et Jones, 2001). Même si la signification de ces similitudes avec les animaux demeure inconnue (le mode d'action des produits des gènes *R* n'est même pas encore connu), elles témoignent de la conservation évolutive de certains domaines appartenant à des protéines associées de près ou de loin à la PCD.

#### 1.4.4.2 La famille Bcl-2 en visite chez les végétaux

Bien que les membres de la famille Bcl-2 soient absentes du règne végétal, leur expression ectopique chez les plantes semble conférer un phénotype de survie ou de mort dépendant de la nature du transgène. En effet, l'expression chez le tabac des protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> et Ced-9 peut retarder ou même inhiber la HR induite par différents pathogènes nécrotrophes. Cette expression peut compromettre la PCD induite par une panoplie de stress abiotiques comme le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, le NaCl, des chocs de température, des UV et des herbicides dont le paraquat, qui entrave la translocation des protons à travers la membrane des thylakoïdes et induit donc la production de ROS et une baisse de la production d'ATP (Mitsuhara *et al.*, 1999; Dickman *et al.*, 2001; Qiao *et al.*, 2002; Li et Dickman, 2004; Chen et Dickman, 2004). D'autre part, l'expression localisée de la protéine pro-apoptotique Bax entraîne la production de lésions simulant la HR (Lacomme et Santa

Cruz, 1999) ou entraîne l'arrêt de croissance et la dégénérescence lorsqu'exprimée dans des protoplastes ou dans des plantes entières de façon inductible (Kawai-Yamada *et al.*, 2001; Baek *et al.*, 2004). Similairement à ce que l'on retrouve chez les mammifères, une localisation de Bax dans les mitochondries végétales est nécessaire à l'induction de la HR (Lacomme et Santa Cruz, 1999; Baek *et al.*, 2004). Fait intéressant, la co-expression d'une *glutathione-dependent phospholipid hydroperoxide peroxidase* d'origine végétale permet de réduire considérablement les effets de Bax, autant dans des feuilles de tabac que dans la levure (Chen *et al.*, 2004), suggérant que le mode d'action de Bax dans les cellules végétales est relié à des excès dans la génération des ROS. Similairement, l'action de Bax dans des protoplastes d'*Arabidopsis* ou chez la levure est atténuée par la surexpression de la *nucleoside diphosphate kinase 2* (AtNDPK2 ; Baek *et al.*, 2004), une protéine impliquée dans le contrôle du potentiel d'oxydo-réduction cellulaire (Moon *et al.*, 2003). De façon générale, l'ensemble de ces observations suggère donc que les membres de la famille Bcl-2 peuvent interférer avec un ou plusieurs sentiers de signalisation « apoptotiques » végétaux conservés dans l'évolution.

#### **1.4.4.3 *Defender against apoptotic cell death (DADI)* est conservé entre les animaux et les végétaux**

Le gène *DADI* a été initialement isolé à partir d'une lignée cellulaire de hamster mutante sensible à la température, c'est-à-dire que les cellules devenaient apoptotiques lorsqu'incubées à une température non-permissive, et a la capacité d'inhiber la PCD développementale chez *C. elegans* (Sugimoto *et al.*, 1995). Des homologues végétaux de *DADI* ont été clonés de différents organismes (van der Kop *et al.*, 2003; Hoeberichts *et al.*, 2001; Lindholm *et al.*, 2000; Dong *et al.*, 1998), et bien que dans certains cas une modeste diminution ou augmentation de l'accumulation de l'ARNm soit observée durant la PCD, des données quelque peu contradictoires d'une étude à l'autre et surtout plutôt limitées ne permettent pas de conclure quoi que ce soit quant à la fonction putative de ce gène dans la PCD végétale. Cependant, le gène semble fonctionnellement conservé entre animaux et végétaux puisque l'homologue d'*Arabidopsis* est aussi efficace que l'homologue humain pour compléter la lignée mutante de cellules de hamster (Gallois *et al.*, 1997). La protéine Dad1 est en fait une sous-unité essentielle de l'oligosaccharyl transférase des

mammifères, un complexe enzymatique impliqué dans la glycosylation et localisé au niveau du RE (Kelleher et Gilmore, 1997; Makishima *et al.*, 1997). Elle fait donc partie de sentiers métaboliques importants et ne semble donc pas être spécifiquement impliquée dans la régulation de la PCD. Cependant, la surexpression de AtDad1 ou AtDad2 dans des protoplastes d'*Arabidopsis* supprime la PCD induite par des radiations UV (Danon *et al.*, 2004), bien qu'il ne soit pas connu si cet effet est direct ou résulte indirectement de l'atténuation de stress au RE.

#### 1.4.4.4 BI-1 à la conquête du Graal

Au moment où les travaux de doctorat faisant l'objet de la présente thèse ont été amorcés, des homologues végétaux de BI-1 (voir section 1.3.5.4) venaient tout juste d'être identifiés chez *A. thaliana* et *Oryza sativa* L. (AtBI-1 et OsBI-1; Kawai *et al.*, 1999). Tout comme son homologue animal (Xu et Reed, 1998), l'expression de OsBI-1 chez la levure inhibe la mort cellulaire induite par l'expression de Bax, suggérant que la fonction de cette protéine serait conservée dans le règne végétal (Kawai *et al.*, 1999). Cependant, la fonction de cette protéine chez les végétaux demeure un mystère, puisqu'aucun homologue végétal de Bax ou de tout autre régulateur pro- ou anti-apoptotique n'a encore été identifié. La présence d'un inhibiteur putatif d'une protéine pro-apoptotique chez les végétaux pourrait être un indice de l'existence de régulateurs végétaux homologues aux membres de la famille Bcl-2 animale. D'un autre côté, cela pourrait aussi indiquer l'existence d'au moins un sentier de mort conservé entre animaux et végétaux dans lequel BI-1 agirait à titre de régulateur négatif. Quoi qu'il en soit, des homologues provenant de d'autres espèces ont été clonés depuis ce temps et plusieurs études ont révélé que BI-1 est bel et bien un régulateur négatif de la PCD chez les végétaux (voir section 5).

## 1.5 Objectifs de la recherche

De façon très générale, le but de ce projet visait à établir une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires conduisant à la PCD chez les végétaux et plus spécifiquement à identifier et caractériser des régulateurs de la PCD. La découverte de BI-1 d'origine animale et la conservation fonctionnelle de ses homologues végétaux dans l'essai chez la levure faisaient de BI-1 un sujet d'étude particulièrement attrayant. Partant de l'hypothèse que BI-1 aurait chez les végétaux une fonction anti-PCD similaire à celle retrouvée chez les animaux, les objectifs spécifiques à atteindre ont été divisés comme suit :

- 1) Cloner des homologues de BI-1 chez d'autres plantes et analyser leur structure secondaire putative;
- 2) Déterminer la localisation intracellulaire de BI-1 chez les végétaux et la levure;
- 3) Déterminer la fonctionnalité d'homologues végétaux de BI-1 chez les animaux;
- 4) Déterminer si BI-1 possède une activité anti-PCD intrinsèque chez les végétaux;
- 5) Élucider les mécanismes de régulation de BI-1 chez les végétaux.

Ces différents objectifs s'inscrivent dans une démarche visant ultimement à comprendre le mode d'action de BI-1 et à élucider le ou les sentier(s) de mort potentiellement conservé(s) dans l'évolution et dans lesquels cette protéine jouerait un rôle clé.

### 1.5.1 Aperçu de la thèse

L'atteinte des objectifs que nous nous étions fixés est décrite dans trois manuscrits constituant les chapitres 2, 3 et 4 de la présente thèse. Plus spécifiquement, le chapitre 2 démontre l'accomplissement des trois premiers objectifs et décrit le clonage et la caractérisation de deux orthologues de BI-1 isolés du tabac (NtBI-1) et du canola (BnBI-1). Grâce à l'expression transitoire ou stable d'une protéine de fusion entre BnBI-1 et la *green fluorescent protein* (GFP), il a pu être déterminé que la protéine est associée aux membranes du RE autant chez les végétaux que chez la levure. De plus, l'inhibition de

l'apoptose induite par Bax par des BI-1 végétaux dans un système cellulaire humain y est décrite.

Le chapitre 3 décrit l'atteinte du 4<sup>e</sup> objectif. Plus précisément, il y est démontré que des lignées cellulaires de tabac présentant des niveaux inférieurs de la protéine NtBI-1 grâce à l'expression d'un ARNm antisens sont plus susceptibles envers une déficience en carbone et entament un programme précoce de PCD comparativement à des lignées contrôles. Ce chapitre met donc en évidence l'implication de BI-1 dans le contrôle de l'induction de la PCD au cours d'une réponse intrinsèque des cellules végétales envers des conditions de disette.

Le chapitre 4 présente quant à lui l'élucidation de certains mécanismes de régulation de BI-1, en réponse au 5<sup>e</sup> objectif. La régulation de l'expression et de l'activité de la protéine est certainement complexe et méritera de plus amples investigations. Cependant, certains éléments forts intéressants sont décrits dans ce chapitre, telle que la modulation de l'expression de BI-1 par les cytokinines, et ce *via* des mécanismes post-transcriptionnels. De même, les effets potentiels de la modulation du Ca<sup>2+</sup> cytosolique sur l'accumulation de ce régulateur anti-PCD y sont explorés.

Finalement, le chapitre 5 présente une rétrospective critique de nos résultats en les confrontant à ceux obtenus parallèlement par d'autres équipes de recherche au fil des années. Par exemple, certaines équipes ont démontré la fonction anti-PCD de BI-1 chez les végétaux par d'autres moyens, essentiellement des modèles d'interaction plante-pathogène. Ce chapitre se veut donc une intégration générale de l'ensemble de la littérature pertinente aux objectifs de recherche que nous nous étions fixés.

Les chapitres 2, 3 et 4 ont leur propre bibliographie en fin de chapitre. Pour ce qui est des chapitres 1 et 5, la bibliographie complète se trouve à la fin de la thèse.

## **CHAPITRE 2**

**Clonage de BnBI-1 et NtBI-1, études de localisation et  
essais fonctionnels dans des cellules humaines**

## **2 Caractérisation moléculaire de deux homologues végétaux de BI-1 ayant la capacité de supprimer l'apoptose induite par Bax dans des cellules 293 humaines.**

Ce chapitre fait l'objet d'une publication dans la revue *Planta* [216 (3), pp. 377-386, 2003] et constitue la version finale telle que publiée dans ce journal. Ce travail est reproduit ici avec la permission du journal. Cet article a été écrit suite à mes travaux. J'ai effectué l'ensemble des figures, à l'exception de la Figure 2-1 qui a été préparée par le second auteur. Ce dernier a également participé aux expériences ayant mené à l'élaboration de la Figure 2-3. Le troisième auteur m'a secondée pour certaines manipulations, entre autres le clonage de NtBI-1 et le marquage *in situ* présenté à la Figure 2-5. J'ai structuré et écrit en grande partie la première version de cet article, en étroite collaboration avec les deuxième et dernière auteurs. J'ai également préparé la version finale de l'article.

## 2.1 Résumé

À ce jour, très peu d'homologues des régulateurs animaux de la mort cellulaire programmée (PCD) ont été identifiés chez les végétaux. Parmi ceux-ci figure Bax Inhibitor-1 (BI-1), qui possède, tout comme son équivalent humain, la capacité de supprimer la mort induite par Bax dans la levure. Puisque le rôle de BI-1 dans la régulation de la PCD végétale est encore inconnu, nous avons cloné *BnBI-1* et *NtBI-1* à partir de banques d'ADNc de canola (*Brassica napus* L.) et de tabac (*Nicotiana tabacum* L.). L'analyse des séquences déduites en acides aminés de BnBI-1 and NtBI-1 a révélé que ces protéines partagent un haut niveau d'identité avec les autres BI-1 d'origine végétale (73-95%) ou animale (26-42%). Des analyses comparatives avec les autres séquences de BI-1 disponibles a permis d'établir un modèle structural présentant sept domaines transmembranaires putatifs. De plus, la co-transfection transitoire de Bax avec BnBI-1 ou NtBI-1 dans des cellules humaines HEK (*human embryonic kidney* 293) a révélé que les deux protéines pouvaient substantiellement inhiber l'apoptose induite par la surexpression de Bax. Des études de localisation ont aussi été conduites en utilisant des transformations stables dans des cellules BY-2 de tabac et de *Saccharomyces cerevisiae*, ou des transformations transitoires dans des feuilles de tabac, avec la protéine de fusion BnBI-1GFP sous le contrôle d'un promoteur constitutif. Tous les transformants montraient une distribution de la fluorescence typique d'une protéine du réticulum endoplasmique (RE). Des expériences de perméabilisation différentielle dans les cellules BY-2 exprimant la fusion BnBI-1GFP ont aussi montré que le C-terminus est localisé du côté cytosolique du RE. L'ensemble de nos résultats suggèrent que BI-1 serait évolutivement conservé et pourrait agir en tant que régulateur clé d'un sentier de mort commun entre les animaux et les végétaux.

## 2.2 Article

**Molecular characterization of two plant BI-1 homologues which suppress Bax-induced apoptosis in human 293 cells**

**Nathalie Bolduc<sup>1</sup>, Mario Ouellet<sup>1</sup>, Frédéric Pitre<sup>1</sup> and Louise F. Brisson<sup>1</sup>**

(1) Department of Biochemistry and Microbiology, Life and Health Sciences Research Building, Laval University, Québec, G1K 7P4, Canada

E-mail: [louise.brisson@rsvs.ulaval.ca](mailto:louise.brisson@rsvs.ulaval.ca)

Fax: 1-418-6567176

### 2.2.1 Abstract

To date, few homologues of animal programmed cell death (PCD) regulators have been identified in plants. Among these is the plant Bax Inhibitor-1 (BI-1) protein, which possesses, like its human counterpart, the ability to suppress Bax-induced lethality in yeast cells. As the role of BI-1 in the regulation of plant PCD remains to be elucidated, we cloned *BnBI-1* and *NtBI-1* from cDNA libraries of oilseed rape (*Brassica napus* L.) and tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). The analysis of the deduced amino acid sequences of BnBI-1 and NtBI-1 indicated that these proteins share a relatively high level of identity with other plant BI-1 proteins (73-95%) as well as with animal BI-1 proteins (26-42%). Comparative analysis with other available plant BI-1 proteins allowed the establishment of a structural model presenting seven transmembrane domains. Moreover, transient co-transfection of Bax with BnBI-1 or NtBI-1 in human embryonic kidney 293 cells revealed that both proteins can substantially inhibit apoptosis induced by Bax overexpression. Localization studies were also conducted using stable transformation of tobacco BY-2 cells and *Saccharomyces cerevisiae*, or transient expression in tobacco leaves, with the fusion protein BnBI-1GFP under control of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. All transformants showed a fluorescence pattern of distribution typical of an endoplasmic reticulum (ER) protein. Results from differential permeabilization experiments in BY-2 cells expressing BnBI-1GFP also showed that the C-terminus is located on the cytosolic side of the ER. Taken altogether, our results suggest that BI-1 is evolutionarily conserved and could act as a key regulator of a death pathway common to plants and animals.

### 2.2.2 Footnotes

**Keywords :** Bax Inhibitor-1; BY-2 cells; Endoplasmic reticulum; Functional death assay; Green fluorescent protein; Programmed cell death.

**Abbreviations :** aBI-1, animal Bax Inhibitor-1; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; HPTM, highly probable transmembrane domain; GFP, green fluorescent protein; pBI-1, plant Bax Inhibitor-1; PCD, programmed cell death; PTM, probable transmembrane domain; TM, transmembrane domain.

### 2.2.3 Introduction

Programmed cell death (PCD) is considered to be a vital phenomenon for multicellular organisms because of its involvement in removing unnecessary or harmful cells during normal development or under pathological conditions. In animals, cells committed to die exhibit characteristic morphological features, such as cell shrinkage, chromatin condensation, DNA and nuclear fragmentation, and formation of apoptotic bodies. Many proteins are implicated in the regulation of PCD, including the Bcl-2 family of proteins, composed of members activating or suppressing death. Their proper orchestration leads to controlled cell autolysis via the activation of effector proteins, mainly endonucleases and cysteine proteases (caspases; for a recent review, see Gallaher *et al.*, 2001).

In plants, it is believed that genetically controlled cell death is an integral part of development and defense response. For example, a number of biochemical and physiological studies have shown the occurrence of PCD during leaf and flower senescence, and xylogenesis, as well as during the establishment of the hypersensitive response (Greenberg, 1996; Pennell and Lamb, 1997). The existence of lesion-mimic mutants (recently reviewed in Shirasu and Schulze-Lefert, 2000), where a localized cell death is triggered due to a genetic defect, also shows the consequence of uncontrolled PCD, and resembles the inappropriate PCD occurring in several human diseases such as Alzheimer's, Parkinson's, AIDS and cancers (reviewed by Vaux and Korsmeyer, 1999). Although considerable differences in the mechanisms of PCD exist between kingdoms, it

appears that many basic hallmarks of apoptosis are conserved among plants and animals (Danon *et al.*, 2000).

Cloning of plant homologues of the Bcl-2 family members has not been reported yet, and no such putative genes have been identified from *Arabidopsis thaliana* genome sequences (Aravind *et al.*, 2001) or from the *Oryza sativa* genome. However, immunological detection of Bcl-2 in tobacco (Dion *et al.*, 1997) and in wheat germ (Kuo *et al.*, 1997) suggests that some regulatory features between animal and plant death processes are similar at the molecular level. Actually, it has been reported that plants expressing animal or viral regulators of cell death (Bax, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-2, CED-9 or Op-IAP) display a death or a survival phenotype depending on the nature of the transgene (Lacomme and Santa Cruz, 1999; Mitsuhashi *et al.*, 1999; Dickman *et al.*, 2001; Kawai-Yamada *et al.*, 2001). Moreover, a plant homologue of the mammalian defender against apoptotic death 1 (*Dad1*) has been cloned from *A. thaliana* and found to be as efficient as human *Dad1* in rescuing mutant hamster cells from apoptosis (Gallois *et al.*, 1997), suggesting the conservation of an apoptosis suppression process between plants and animals.

Another mechanism of suppression conserved throughout evolution involves a regulator referred to as Bax Inhibitor (BI-1). The *BI-1* gene was first isolated from a human cDNA library because of its ability to block cell death induced by the overexpression of the pro-apoptotic Bax in yeast (Xu and Reed, 1998). Plant homologues have been subsequently cloned from *A. thaliana* and *O. sativa*, and it has been shown that both plant BI-1 (pBI-1) proteins could suppress Bax-induced lethality in yeast (Kawai *et al.*, 1999; Sanchez *et al.*, 2000). The cloning of a homologue from *Hordeum vulgare* has also been reported (Hückelhoven *et al.*, 2001). Recently, it has also been demonstrated that AtBI-1 can suppress Bax-induced lethality in *A. thaliana* (Kawai-Yamada *et al.*, 2001), reinforcing the hypothesis of evolutionarily conserved cell death mechanisms between plants and animals. However, the precise role of BI-1 protein in plant cells and its mechanism of action remain to be determined. In this article, we present the cloning of two pBI-1 homologues from *Brassica napus* and *Nicotiana tabacum*, and show the high level of conservation of BI-1 proteins across the plant and animal kingdoms through computer analysis, localization studies and functional assays in animal cells.

## 2.2.4 Materials and methods

### 2.2.4.1 Cloning of *AtBI-1* homologues and sequence analysis

*BnBI-1* and *NtBI-1* cDNA clones were obtained by cDNA library screening using a PCR approach as described by Amaravadi and King (1994). For this purpose, primers (Bn1: 5'-GATTCTCTTAAAACTTCCGTCAGATTCT-3' and Bn2: 5'-ATAGTCCATGTCACCGAGGTGTGC-3') were designed to amplify a 567-bp fragment in the coding region of *AtBI-1*. The rapeseed library was constructed in  $\lambda$ ZapExpress (Stratagene) from leaves of *Brassica napus* L. cv. Westar, and the tobacco library was constructed in  $\lambda$ ZapII from young leaves of *Nicotiana tabacum* L. cv. SR1 (pre-made library from Stratagene, cat. # 936002). Identity of full-length positive clones was confirmed by automatic sequencing and plasmids were named pBK-CMV-BnBI-1 and pBSK-NtBI-1. Predicted amino acid sequences were analyzed by using several programs to predict the localization (PSORT, ChloroP, TargetP, iPSORT) or the transmembrane regions and topology (SOSUI, TMpred, TMHMM, TopPred) of the cognate protein. To consolidate the different predicted transmembrane domains (TMs) into a single model, all predictions (each program for each sequence) were compared in aligned sequences, with a particular attention to plant proteins. To be included in a highly probable transmembrane domain (HPTM), a particular position had to be predicted as part of a TM for at least three of the five plant sequences by at least three algorithms out of four. An amino acid is included in a probable transmembrane region (PTM) when its position was predicted to be part of a TM in at least 20% of plant predictions.

### 2.2.4.2 Plasmid construction

All constructions for plant cell transformation were made in pBI121. The fusion protein BnBI-1GFP was obtained following the amplification of the open reading frame (ORF) of *BnBI-1* from the vector pBK-CMV-BnBI-1 using primers identified as Bn3 and Bn4 (Bn3: 5'-AAGCTCTAGAAAACAAAAGGCATGGA-3'; Bn4: 5'-ACTTTTTGGATCCAGTTCCTCCTCCTCTT-3') containing, respectively, an *Xba*I and a *Bam*HI site. The PCR product was then subcloned in the *Xba*I and *Bam*HI sites of pBI121

to give the pBI121-BnBI-1 plasmid. The green fluorescent protein (GFP) gene (S65T mutant) was provided as a cassette (35S-GFP-nos) introduced in a pUC vector. Primers (GFP1: 5'-ATGGATCCAAGGAGGTTCTATGGTGAGCAAGGGC-3' and nosE: 5'-ACGGCCAGTGAATTCCCGATCTAGTAA-3'), containing, respectively, a *Bam*HI and an *Eco*RI site, were used to amplify both the entire gene encoding for the GFP and the nopaline synthase (nos) terminator. The PCR product was then subcloned in the *Bam*HI and *Eco*RI sites of pBI121-BnBI-1 or pBI121, replacing the  $\beta$ -glucuronidase (*GUS*) gene and the nos terminator to produce the final constructs pBI-BnBI-1GFP and pBI-GFP, respectively. For the construction of pVT102U-BnBI-1GFP, a BnBI-1GFP fragment, obtained from pBI-BnBI-1GFP by digestion with *Xba*I and *Pst*I, was subcloned in the same sites in pVT102U (Vernet *et al.*, 1987), downstream of the alcohol dehydrogenase (ADH) promoter. All constructions in the pcDNA3 plasmid were done by insertion of the gene of interest into the multiple cloning site, using standard molecular biology techniques (Sambrook *et al.*, 1989). *Bax* and *Bcl-2* genes were from mouse, while the *GUS* gene was excised from pBI121. The proper construction of all plasmids was confirmed by automatic sequencing.

#### 2.2.4.3 Cell death assays

Human embryonic kidney 293 cells were maintained in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). Cell death assays were performed essentially as described by Xu and Reed (Xu and Reed, 1998), with minor modifications. Briefly, cells were seeded ( $8 \times 10^5$ ) in 60-mm dishes in 4 ml of culture medium and transfected 24 h later by a calcium phosphate precipitation method (Sambrook *et al.*, 1989), with pcDNA3 plasmids encoding *Bax*, *Bcl-2*, BnBI-1, NtBI-1 or nothing (control). Transfections were performed with a total of 9  $\mu$ g DNA (adjusted with control vector). Precipitates were removed 7 h later and replaced with fresh medium. Both floating and adherent cells (after trypsinization) were collected 24 hr after transfection and the percentage of dead cells was determined by trypan blue dye-exclusion assay (0.1% trypan blue in PBS), counting a minimum of 300 cells per assay. Fragmentation of nuclei associated with apoptosis was also verified by 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining as described previously by Zha and co-workers (Zha *et al.*, 1996). Transfection

efficiency was estimated to be at least 65% by co-transfection with a GUS reporter plasmid (pcDNA3-GUS). For this purpose, 1 µg of pcDNA3-GUS was included in transfection experiments and GUS activity was detected by incubating cells overnight at 37°C in the presence of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-glucuronide (X-Gluc) as described elsewhere (Gallagher, 1992). The percentage of cells presenting a blue precipitate was then determined under light microscopy.

#### 2.2.4.4 Northern blot analysis

Total RNAs were isolated from different tissues using a guanidium isothiocyanate (GITC) method with the inclusion of 2% high-molecular-weight polyethylene glycol (Sigma # P-2263) in the extraction buffer, as described by Gehrig and collaborators (2000). RNA (20 µg) was fractionated on 1% agarose formaldehyde gels, and transferred to nylon membranes (Hybond-XL; Amersham Pharmacia Biotech). Membranes were then hybridized in Church's buffer (1% BSA; 1 mM EDTA; 0.5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.2; 7% SDS) at 65°C to the appropriate probes (full-length cDNA of *BnBI-1* or *NtBI-1*) labeled by random-priming with [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP. Membranes were washed at high stringency (0.2X SSC and 0.1% SDS at 65°C), and signals were detected following exposure to X-ray films (BioMax MR; Kodak) under intensifying screens at -80°C (exposure time varied from 16 to 48 h).

#### 2.2.4.5 Plant material and transformation

Cell suspension cultures of *N. tabacum* cv. BY-2 were maintained in modified MS medium [MS salts; Murashige and Skoog, 1962), 100 mg/l *myo*-inositol, 255 mg/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 30 g/l sucrose, 0.2 mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 1 mg/l thiamine HCl] in the dark, with agitation at 100 rpm. Cells were subcultured every 7 days by transferring 1.1 ml to 50 ml of fresh medium in a 250-ml Erlenmeyer flask. Stable transformation was achieved by a standard co-culture method (for 3 days in the presence of 20 µM acetosyringone) using *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 bearing the appropriate binary vector (pBI-

GFP or pBI-BnBI-1GFP). Transformants were selected on solid growth medium supplemented with 100 µg/l kanamycin (Sigma).

Plant materials for transient expression or mRNA analysis (*N. tabacum* cv. Xanthi NC and *B. napus* cv. Westar) were grown in a greenhouse under a 16 hr photoperiod. Transient expression in tobacco leaves was performed essentially as described by Rubino *et al.* (2001) with some modifications. Briefly, *Agrobacterium* cells were grown to late logarithmic phase, washed once in sterile infiltration medium [MS salts; (Murashige and Skoog, 1962); 10 mM Mes, pH 5.6; 20 g/l sucrose; 200 µM acetosyringone], and resuspended in the same medium to an OD<sub>600</sub> of 3.0. The bacterial preparation was pressure-infiltrated into the abaxial surface of fully expanded tobacco leaves (6-week-old plants) with a 10-ml syringe without needle. Transient expression of GFP was observed 3-6 days later by confocal microscopy.

#### 2.2.4.6 Yeast methods

The *Saccharomyces cerevisiae* strain used was 842 (*MATa/MATα, leu2-3/leu2-3, ade2-1/ade2-1, his3-11/his3-11, ura3-52/ura3-52, trp1-1/trp1-1*). Cells were grown under standard conditions in either YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) or in synthetic medium (SD: 0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 2% glucose) supplemented with essential amino acids (minus uracil) for maintenance of plasmid selectable marker. Cells were transformed using a lithium acetate method, as described by Xu and co-workers (1999). For microscopic examination, exponentially growing cells were fixed in 4% paraformaldehyde (in PBS) overnight at 4°C, extensively washed in PBS, stained with DAPI (1 µg/l) for 10 min at room temperature, washed again in PBS and examined as described under *Microscopic examinations*.

#### 2.2.4.7 Immunoblot analysis

Cells (293) were pelleted by centrifugation at 300 g and then incubated for 5 min in boiling lysis buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 6.8; 5% SDS; 20% glycerol; 5 mM EDTA) before being

centrifuged (10,000 g, 5 min, 4 °C). Samples were loaded (30 µg per lane) onto SDS-12% polyacrylamide gels and further transferred to PVDF membranes (Hybond-P; Amersham Pharmacia Biotech). Antigen detection was performed using the following antibodies and dilutions: mouse anti-Bax (amino acids 8-16 of the murine Bax; Calbiochem), 1 µg/l; goat anti-Bcl-2 (R&D Systems Inc.), 1 µg/l; goat anti-mouse IgG and donkey anti-goat IgG (horseradish peroxidase-conjugated; Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.), 0.5 µg/l. Bound antibodies were detected using a chemiluminescent substrate (Lumi-Light; Roche Molecular Biochemicals).

#### **2.2.4.8 Immunofluorescence labelling**

Determination of the topological orientation of the GFP-tagged C-terminal of BnBI-1 protein was performed essentially as described by Trelease *et al.* (1996) and Dyer and Mullen (2001), but stable transformants were used as starting material. Briefly, exponentially growing BY-2 cells were fixed and differentially permeabilized using either digitonin or Triton X-100, then labeled with rabbit anti-GFP (Clontech Laboratories; dilution 1:1000). Cells were then washed, and bound immunoglobulins were detected using goat anti-rabbit Cyanine-3 (Cy3) fluorescent dye-conjugated antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories; dilution 1:500). Labeled and control cells were observed by confocal microscopy.

#### **2.2.4.9 Microscopic examinations**

Yeasts expressing GFP or DAPI-stained 293 cells were examined under a Zeiss Axioplan microscope equipped for epifluorescence and Nomarski microscopy. Yeasts and 293 cells were photographed with Fujicolor NHGII800 film and Fujicolor Superia 200 film, respectively. Tobacco cells were observed by confocal laser scanning microscopy (CLSM) using a Zeiss LSM310 instrument. Images of GFP-expressing cells were acquired using the 488-nm excitation line of an argon ion laser with a 515/565 bypass filter. Transient expression of GFP was observed on thin leaf sections (hand cut with a razor blade) mounted under a cover glass with a drop of BY-2 medium. Mitochondria were labeled with MitoTracker Orange (CM-H<sub>2</sub>TMRos; Molecular Probes) according to Köhler *et al.* (1997).

MitoTracker Orange, chlorophyll and Cy3 fluorescent dye were visualized by using the 543-nm excitation line of a helium/neon ion laser with a 543 longpass filter. Acquired images were further processed with Corel Photo-Paint 8.

## 2.2.5 Results

### 2.2.5.1 Cloning and sequence analysis of rapeseed and tobacco *BI-1*

In order to isolate *BI-1* homologues from rapeseed and tobacco, a set of primers was designed to amplify a 567-bp fragment in the coding region of *AtBI-1*. These primers amplified a fragment of the expected length when using whole cDNA libraries derived from leaves of rapeseed or tobacco as templates (data not shown). Sequencing of these fragments revealed high identity with *AtBI-1*, suggesting that these primers could serve for the screening of the two libraries. These screenings resulted in the isolation of two full-length cDNA clones named *BnBI-1* and *NtBI-1* (GenBank accession numbers AF390555 and AF390556). *BnBI-1* consists of 1,010 bp and predicts a 741-bp open reading frame encoding a 27.5-kDa protein of 247 amino acids. *NtBI-1* consists of 1,293 bp and predicts a 747-bp open reading frame encoding a 27.6-kDa protein of 249 amino acids.

The analysis of the deduced amino acid sequences of BnBI-1 and NtBI-1 indicates that these proteins share a relatively high level of identity with other pBI-1 proteins, as well as with animal BI-1 (aBI-1) proteins (Figure 2-1A). For example, BnBI-1 and NtBI-1 share, respectively, 93% and 75% identity with AtBI-1, while they are 66-68% identical to OsBI-1 and HvBI-1. All predicted pBI-1 proteins share 38-42% identity with the human or rat BI-1, while the identity drops to 26-28% when compared with *Drosophila* BI-1. Similarity between the predicted proteins spans over the entire length of the sequence, except for the N-termini, where many amino acids are lacking in the alignment. Divergence between predicted sequences is represented as an inferred tree in Figure 2-1B. It is noteworthy that plant sequences are grouped together apart from animal sequences, with a separation between monocotyledonous and dicotyledonous species, the latter being divided according

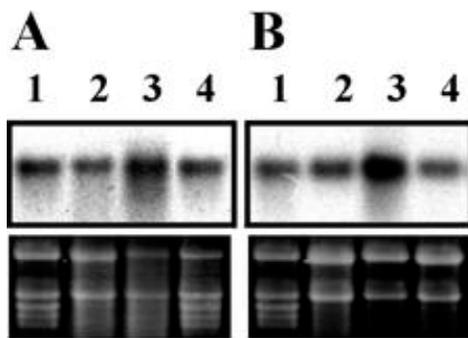


**Figure 2-1 : Comparison of plant and animal BI-1 deduced amino acid sequences.**

**A)** Alignment generated with Clustal\_X (Thompson *et al.*, 1997) and displayed using BOXSHADE (GCG package). Amino acids identical and similar to a computer-generated consensus sequence are shaded *black* and *gray*, respectively. *Bars with Roman numbers* show predicted plant HPTMs (*black*) and their variable ends (PTMs; *half-tone*). Charged residues of plant TMs are identified within the bars. **B)** Unrooted tree generated with Clustal\_X and displayed by TreeView (Page, 1996). Branch lengths are drawn to scale and numbers indicate how many times this tree was produced out of 1,000 attempts using the bootstrap option of Clustal\_X. BI-1 sequences used: *Bn*, *Brassica napus* (accession number AAK73101); *Nt*, *Nicotiana tabacum* (AAK73102); *At*, *Arabidopsis thaliana* (BAA89541); *Hv*, *Hordeum vulgare* (CAC37797); *Os*, *Oryza sativa* (BAA89540); *hu*, human (P55061); *Rn*, *Rattus norvegicus* (P55062); *Dm*, *Drosophila melanogaster* (Q9VSH3).

Hydropathy analysis and targeting-motif detection for both BnBI-1 and NtBI-1 predicted proteins strongly suggest their association with plant membranes. According to PSORT, iPSORT and ChloroP programs, both proteins could be located within the thylakoid membranes. On the other hand, basic residues at their C-terminal end look like some nuclear targeting sequences (Dingwall and Laskey, 1991), which were also detected by PSORT. Furthermore, it seems that BI-1 proteins display five to seven transmembrane helices (TMs), depending on the software used for the analysis. As illustrated in Figure 2-1A, we propose a model for pBI-1 composed of seven TMs, determined following the comparison of predicted TMs for the five aligned pBI-1 sequences (see *Materials and methods*). These TMs are divided into highly probable (HPTM) and probable (PTM) transmembrane domains, in order to illustrate the variation in TM ends between different sequences. Almost all HPTM domains (I-VI) of this model also apply to aBI-1, while the PTM ones might be slightly different. Although predicted structural features seem to be highly conserved among different species, most programs failed to attribute TM VII to the animal sequences used in this study. It is of interest that a few charged residues are present in some TMs, particularly in the plant TM VII, which display features of an amphipathic helix (charged residues mostly aligned on the same side of the  $\alpha$ -helix), suggesting interactions with other membrane proteins. It is worth noting that the most favored topology placed the C-termini on the cytosolic side for both plant and animal BI-1 proteins, thus placing the N-terminal end on the inner side of the membrane for pBI-1 and in the cytosol for aBI-1.

Southern blot analysis at high stringency revealed that *BnBI-1* is present as a two-copy gene, while *NtBI-1* is present as a single-copy gene (data not shown). Northern blot analysis (Figure 2-2) showed that mRNA levels remained relatively constant regardless of the organ, both in *B. napus* and *N. tabacum*. However, an increased accumulation was observed in senescing flowers, a situation known to involve PCD (Rubinstein, 2000). The length of messengers detected on Northern blots was estimated to 1,200 bp for *BnBI-1* and 1,350 bp for *NtBI-1*, values that are consistent with the length of the cloned cDNAs.



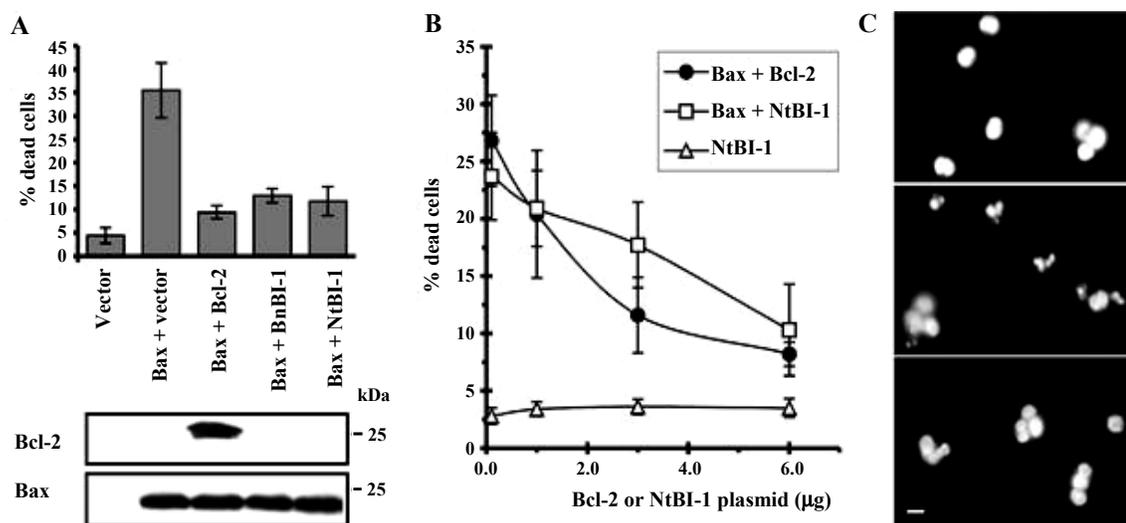
**Figure 2-2** : Accumulation of BnBI-1 and NtBI-1 transcripts in plant organs.

**A)** BnBI-1 accumulation in leaves (1), flowers (2), senescing flowers (3) and shoots (4). **B)** NtBI-1 accumulation in leaves (1), flowers (2), senescing flowers (3) and cultured suspension cells (4). Ethidium bromide-stained gels with approximately equal amounts of total RNA in each lane are also shown (*lower panels*).

#### 2.2.5.2 Plant homologues of BI-1 suppress Bax-induced apoptosis in human 293 cells

The functional assay developed by Xu and Reed (1998) to evaluate the ability of human BI-1 to suppress Bax-induced apoptosis in mammalian cells was used to estimate the suppressor capacity of its plant homologues. Human embryonic kidney 293 cells were transfected with an expression plasmid encoding Bax (pcDNA3-Bax) in combination with equal amounts of either pcDNA3 parental vector (used as a negative control), pcDNA3-BnBI-1, pcDNA3-NtBI-1 or pcDNA3-Bcl-2 (used as a positive control). Using this model system, expression of Bax resulted in the death of more than 30% of the cells, compared with less than 5% following transfection with parental vector (Figure 2-3A). However,

when cells expressed both Bax and BnBI-1, NtBI-1 or Bcl-2, the percentage of dead cells was substantially lower, with 12, 11 and 10%, respectively, indicating that both pBI-1 homologues and Bcl-2 can suppress Bax-induced apoptosis at a similar level. Production of Bax and Bcl-2 in transfected cells was attested by immunoblot analysis (Figure 2-3A).



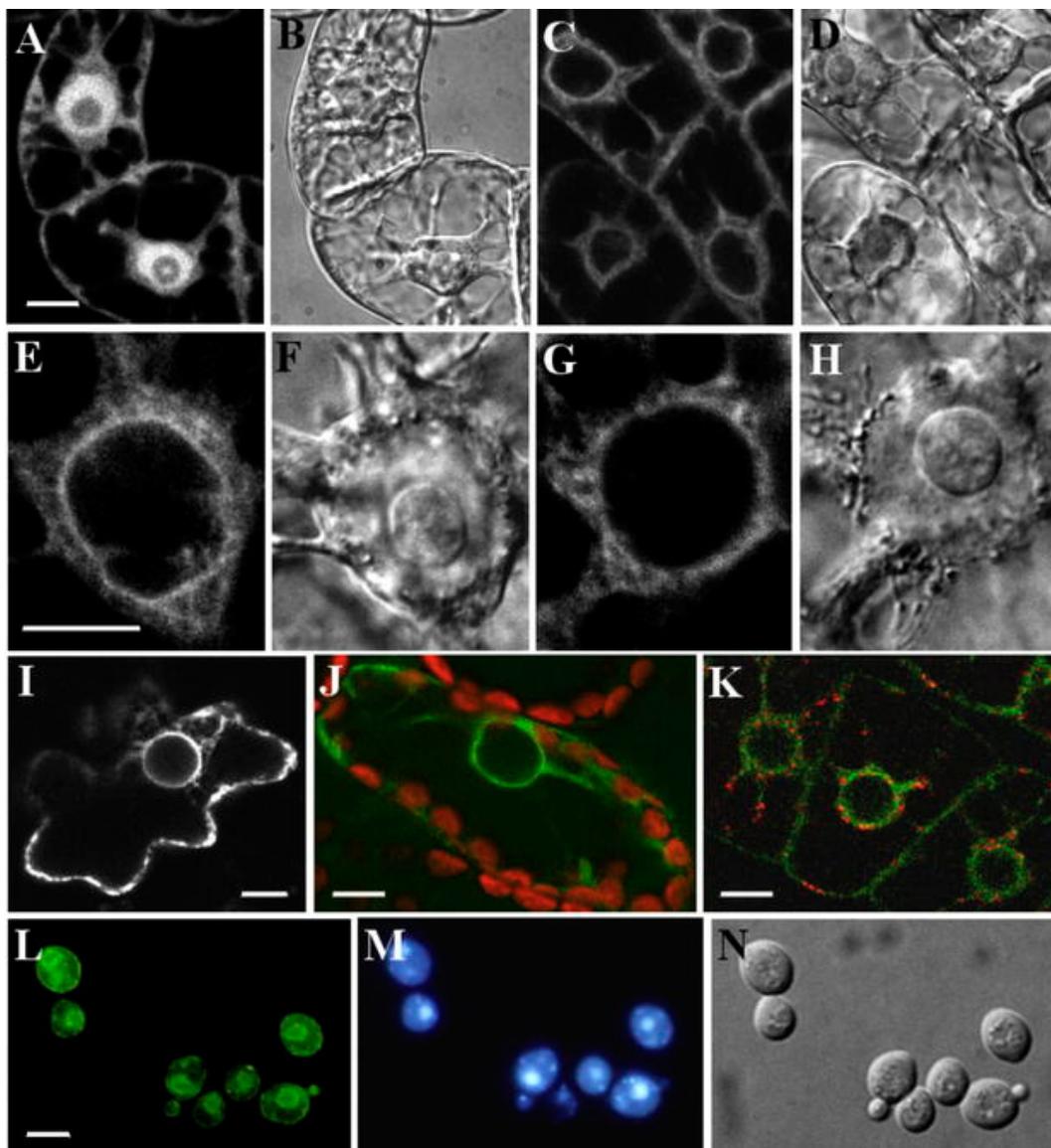
**Figure 2-3 : Death assays in human 293 cells.**

**A)** Cells were either transfected with control vector (9  $\mu\text{g}$ ), or co-transfected with pcDNA3-Bax (3  $\mu\text{g}$ ) together with control vector (6  $\mu\text{g}$ ) or pcDNA3 plasmids encoding Bcl-2, BnBI-1 or NtBI-1 (6  $\mu\text{g}$ ). The percentages of dead cells were determined using trypan blue dye-exclusion assay (*top*). Protein extracts from transfected cells were subjected to immunodetection using antibodies specific for Bcl-2 and murine Bax proteins (*bottom*). **B)** Dose-dependent suppression of Bax-induced cell death by Bcl-2 and NtBI-1. Cells were either transfected with 0.1-6  $\mu\text{g}$  pcDNA3-NtBI-1, or with 3  $\mu\text{g}$  pcDNA3-Bax and 0.1-6  $\mu\text{g}$  pcDNA3 encoding Bcl-2 or NtBI-1 (total DNA adjusted to 9  $\mu\text{g}$  with control vector). **C)** Nuclear morphology (DAPI staining) in human 293 cells transfected with 9  $\mu\text{g}$  control vector (*top*), 3  $\mu\text{g}$  pcDNA3-Bax (*middle*) or 3  $\mu\text{g}$  pcDNA3-Bax and 6  $\mu\text{g}$  pcDNA3-NtBI-1 (*bottom*). Bar = 10  $\mu\text{m}$ . Quantitative data shown (**A**, **B**) are means  $\pm$  mean deviation of triplicate experiments.

To further investigate the dose-dependency relationship between pBI-1 concentration and suppression of Bax-induced death, cell death assays were performed with different quantities of Bcl-2- and NtBI-1-encoding plasmids (Figure 2-3B). In both cases, co-transfection of cells with 3  $\mu\text{g}$  of pcDNA3-Bax and 0.1 or 1.0  $\mu\text{g}$  of death suppressor-encoding plasmids did not substantially reduce the percentage of dead cells when compared with a total absence of death suppressor (evaluated to  $25\pm 1\%$  in this experiment; data not shown). Nevertheless, appreciable reduction in the percentage of dead cells was observed when pcDNA3-Bcl-2 reached 3  $\mu\text{g}$ , while 6  $\mu\text{g}$  of pcDNA3-NtBI-1 was needed to inhibit cell death efficiently. It is of note that transfection of 293 cells with 0.1-6  $\mu\text{g}$  of pcDNA3-NtBI-1 plasmid did not promote cell death (less than 5% cell death). Figure 2-3C shows nuclear fragmentation associated with Bax expression in 293 cells, which is only rarely observed when cells are transfected with control vector alone or co-transfected with pcDNA3-Bax (3  $\mu\text{g}$ ) and pcDNA3-NtBI-1 (6  $\mu\text{g}$ ).

#### **2.2.5.3 BnBI-1 is located in the endoplasmic reticulum (ER) of tobacco and yeast cells**

The cellular localization of pBI-1 was observed by confocal microscopy using the construction pBI-BnBI-1GFP in which the GFP protein was fused to the C-terminal end of BnBI-1. GFP was observed either in stably transformed tobacco BY-2 cells cultivated in vitro or observed in planta following a transient-expression assay in tobacco leaves, and compared with cells transformed with untargeted GFP, or GFP targeted to the ER by way of a KDEL signal sequence at its C-terminus (ER-GFP; Collings *et al.*, 2000). The identity of organelles such as nuclei and vacuoles was verified by observing cells under Nomarski optics.



**Figure 2-4 : Localization microscopy of BnBI-1GFP in plant and yeast cells.**

Plant cells were viewed under a confocal microscope at an excitation wavelength of 488 nm (A, C, E, G, I-K) and 543 nm (J-K), or using Nomarski optics (B, D, F, H). A-H) Tobacco BY-2 cells stably transformed with GFP (A-B), BnBI-1GFP (C-F) or ER-GFP (G-H). I-J) Transient expression of BnBI-1GFP in tobacco leaf epidermal (I) and palisade mesophyll (J) cells. In J, fluorescence emissions from chlorophyll and GFP are shown in red and green, respectively. K) Staining of mitochondria with MitoTracker Orange (red fluorescence) in BY-2 cells expressing BnBI-1GFP (green fluorescence). L-N) Yeast cells transformed with BnBI-1GFP were stained with DAPI, then examined for GFP fluorescence (L), DAPI fluorescence (M) or with Nomarski optics (N). Bars = 10  $\mu$ m (A-K), 5  $\mu$ m (L-N).

BY-2 cells expressing GFP showed diffuse fluorescence distributed throughout the cytoplasm and in the nucleoplasm (Figure 2-4A, B), as previously described by Köhler *et al.* (1997). In contrast, the fluorescence was mainly detected within and in the vicinity of the nuclear envelope as well as in the cytoplasm in BY-2 cells expressing BnBI-1GFP, while no fluorescence was observed in the nucleoplasm (Figure 2-4C-F). Examination of this cell line at higher magnification (Figure 2-4E, F) showed a fine fluorescent network extending into the cytoplasm, which strongly suggests an association with membranes. This subcellular distribution of the fluorescent signal fits perfectly with that observed in BY-2 cells expressing ER-GFP (Figure 2-4G, H), as well as with that reported in a number of recent studies for ER-targeted GFP (Boevink *et al.*, 1996;Collings *et al.*, 2000;Koizumi *et al.*, 2001;Dunoyer *et al.*, 2002). It is noteworthy that a strong perinuclear fluorescence was observed in nuclei isolated from BnBI-1GFP-expressing cells (data not shown), suggesting the association of BnBI-1 with the perinuclear region of the ER.

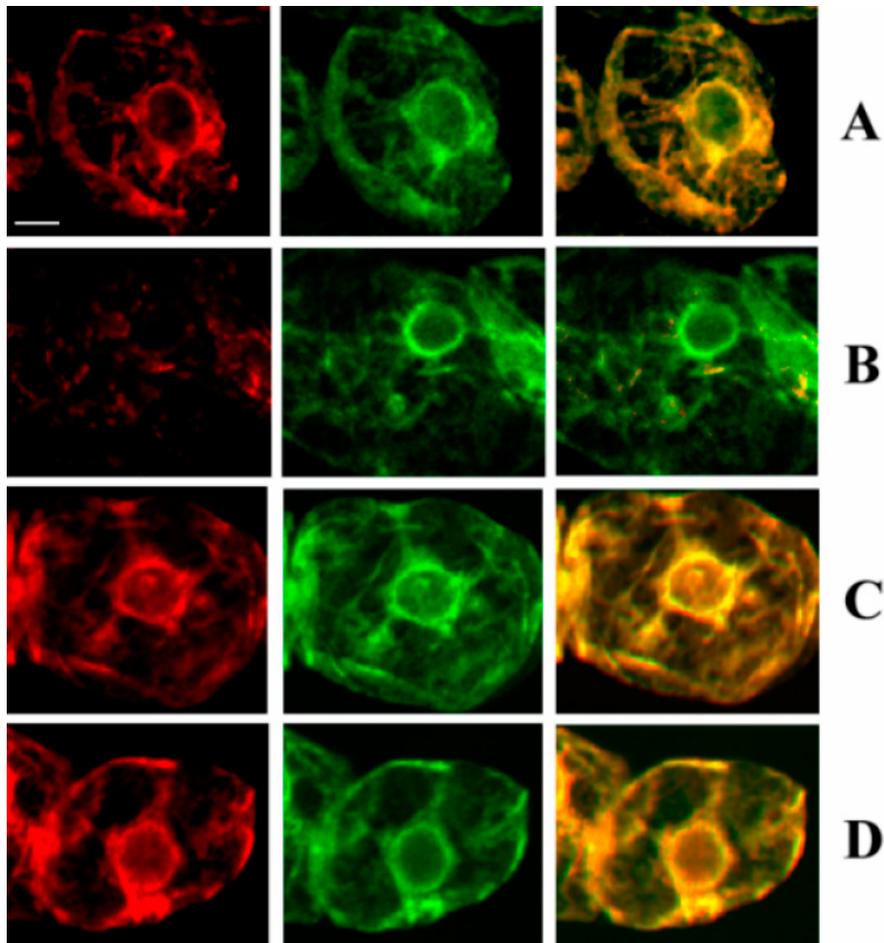
Visualization of BnBI-1GFP in tobacco leaves following transient expression showed an intracellular pattern of distribution closely related to that observed in BY-2 cells expressing BnBI-1GFP (Figure 2-4I, J). In palisade mesophyll cells, BnBI-1GFP did not co-localize with the red autofluorescence from chloroplasts (Figure 2-4J). Moreover, use of MitoTracker to visualize mitochondria in living BY-2 cells expressing BnBI-1GFP failed to show a co-localization with mitochondria (Figure 2-4K).

The fusion protein BnBI-1GFP was also expressed in yeast. *Saccharomyces cerevisiae* cells expressing GFP were stained with DAPI and pictures were taken under epifluorescence microscopy (Figure 2-4L-N). Comparison of the fluorescence from the GFP fusion (Figure 2-4L) with that from the DAPI-stained nuclear DNA (Figure 2-4M) showed that the protein is mainly localized in the perinuclear area, and to a lesser extent in the cytoplasm and cell periphery. This pattern of expression is typical of ER-localized proteins in yeast (Rose *et al.*, 1989;Preuss *et al.*, 1991;Hampton *et al.*, 1996).

#### **2.2.5.4 The C-terminus of BnBI-1 is located on the cytosolic side of the ER**

To test the topological orientation of the C-terminal extremity of BnBI-1 protein in ER membranes, non-transformed and stably transformed tobacco cells were differentially permeabilized using either digitonin or Triton X-100, then processed for immunofluorescence microscopy using anti-GFP antibody. Digitonin selectively permeabilizes the plasma membrane but not internal cellular membranes, while Triton X-100 perforates both, thus allowing the selective immunodetection of cytosol-located antigens when using digitonin (Dyer and Mullen, 2001).

Control experiments with untransformed cells or transformed cells with omission of the primary antibody showed little unspecific background staining, regardless of the permeabilization procedure (data not shown). As shown in Figure 2-5A, permeabilization of cells expressing ER-GFP with Triton X-100 allowed the immunodetection of GFP in a pattern similar to the ER-GFP fluorescence. However, immunodetection was restricted to a few sites in digitonin-permeabilized cells (Figure 2-5B), possibly resulting from some leakage of ER-GFP during the cell fixation and labeling. These observations confirm that antigen sites located in the ER lumen are accessible in cells permeabilized with Triton X-100 but not with digitonin. As shown in Figure 2-5C and D, permeabilization of membranes with either Triton X-100 or digitonin in BnBI-1GFP-expressing cells resulted in similar patterns of immunodetection. In both cases, the fluorescent signals coming from the immunodetection were superposable on those coming from GFP fused to BnBI-1, indicating that labeling was highly specific. Taken together, these observations suggest that the C-termini of BnBI-1GFP would be located on the cytosolic side of the ER membrane.



**Figure 2-5** : Immunofluorescence images revealing the membrane topology of BnBI-1GFP in differentially permeabilized tobacco cells.

Fixed cells were permeabilized using either Triton X-100 (**A**, **C**) or digitonin (**B**, **D**), labeled with anti-GFP antibody and Cy3-conjugated anti-rabbit antiserum, then viewed using confocal microscopy at an excitation wavelength of 543 nm (*left panels*). Cells were also viewed at 488 nm to see GFP fluorescence in membranes (*middle panels*). Superposition of the two images is also shown (*right panels*). **A-B**) ER-GFP-expressing cells. **C-D**) BnBI-1GFP-expressing cells. Bar = 10  $\mu$ m.

### 2.2.6 Discussion

From the wealth of genomic information and with the completion of the *Arabidopsis* and rice genome sequences, we have to notice that few animal cell-death regulators appear to have sequence homologues in plants (Aravind *et al.*, 2001). However, the cloning of *BI-1* from *Arabidopsis* and rice and the discovery of their capability to successfully inhibit Bax-induced lethality in yeast (Kawai *et al.*, 1999; Sanchez *et al.*, 2000) suggested an important conservation of this protein in evolution. In this work, BI-1 clones have been isolated from rapeseed and tobacco. Comparative study of various sequences was then facilitated with these two new clones (see Figure 2-1). Actually, our sequence analysis of a number of BI-1 proteins from plant and animal kingdoms showed a high level of similarity. This similarity was particularly relevant among plant members, with the expected separation between monocotyledonous and dicotyledonous species.

Analysis of plant BI-1 sequences (Figure 2-1) revealed the presence of seven potential transmembrane domains referred to as TM I to TM VII, indicative of an integral membrane protein. The overall position of these predicted TMs in pBI-1 proteins matches those found in aBI-1, with the exception of TM VII, predicted exclusively in plants, suggesting a conservation of the protein structure in evolution. It is interesting that some TMs carry charged or polar residues, a situation giving unfavorable thermodynamic characteristics to transmembrane helices. These residues could be implicated in the consolidation of protein tertiary structure, or in the stabilization of interactions with other proteins. Moreover, the presence of charged residues aligned on the same side of the predicted  $\alpha$ -helix VII could result in the formation of an amphipathic helix, which could be stabilized in protein-protein interactions. The presence of numerous transmembrane helices with charged and polar residues might also imply that BI-1 would function as an ion channel, as previously suggested by Xu and Reed (Xu and Reed, 1998).

It has been previously shown that both plant and animal BI-1 can suppress Bax-induced lethality in yeast (Xu and Reed, 1998; Kawai *et al.*, 1999; Sanchez *et al.*, 2000), and now we show that pBI-1, like its human counterpart (Xu and Reed, 1998), can suppress Bax-

induced apoptosis in human 293 cells (Figure 2-3). Interestingly, it has been recently reported that AtBI-1 suppresses Bax-induced lethality in *Arabidopsis* (Kawai-Yamada *et al.*, 2001). Taken together with our computer analysis, these observations raise the possibility of an evolutionarily conserved cell-death pathway, where BI-1 would act as a negative regulator of death. However, Yu and co-workers (Yu *et al.*, 2002) recently demonstrated that AtBI-1 can induce death in human fibrosarcoma HT1080 cells, whereas our results show the opposite in human embryonic kidney 293 cells. We have also found that *BnBI-1* and *NtBI-1* mRNAs accumulated to a higher level in flowers undergoing senescence (Figure 2-2), and Sanchez and his co-workers (Sanchez *et al.*, 2000) have shown that *AtBI-1* mRNA is up-regulated following wounding or pathogen attack. Moreover, a *pBI-1* homologue found in a *Pinus taeda* xylem cDNA library (Center for Computational Genomics and Bioinformatics, University of Minnesota) was found to be a relatively abundant messenger (about 600th out of 15,000 cDNAs; John MacKay, personal communication). Up-regulation of pBI-1 in PCD situations could suggest that in some cellular contexts it would function as a pro-apoptotic protein, maybe depending on the presence or absence of specific binding partners. Accordingly, Xu and Reed (Xu and Reed, 1998) have demonstrated by in vivo cross-linking and co-immunoprecipitation studies that human BI-1 can interact with Bcl-2 and Bcl-X<sub>L</sub> but not Bax or Bak, suggesting that BI-1 can interfere with a number of death regulators. Therefore, it is possible that potential endogenous binding partners would be different in HT1080 and 293 cells, leading to different responses when pBI-1 is expressed.

There is much evidence arguing for the integration of life and death signals in the plant mitochondrion, as in mammalian mitochondria (Jones, 2000). pBI-1, as a non-mitochondrial protein (this study; Kawai-Yamada *et al.*, 2001), would potentially act downstream of mitochondria. Our localization studies in stably transformed tobacco BY-2 cells indicated that, like its human counterpart (Xu and Reed, 1998), BnBI-1GFP is mostly localized to the ER and the perinuclear region (Figure 2-4). This result is in agreement with those of Kawai-Yamada and co-workers (Kawai-Yamada *et al.*, 2001) while expressing AtBI-1GFP. The same conclusions came from our transitory expression in tobacco leaves. Moreover, we have shown that expression of BnBI-1GFP in yeast gives a similar pattern of

expression, suggesting that inhibition of Bax lethality in humans, yeast and plants would act through similar pathways.

Both our computer analysis and experimental data showed that the short extra-membranous C-termini of plant BI-1 would be located on the cytosolic side of membranes (Figure 2-5). This extremity is well conserved among plant members, suggesting a potential domain for interaction with cytosolic proteins. Actually, Yu and co-workers (Yu *et al.*, 2002) reported an apparent increase in cell death following transfection of HT1080 cells with a carboxyl-terminal (14 amino acids) truncated AtBI-1. On the other hand, they also mentioned unpublished results indicating that this mutant was unable to suppress Bax-induced lethality in yeast. Taken altogether, these lines of evidence let us hypothesize that the C-terminus is an important domain for pBI-1 activities. However, the N-terminus is more divergent, suggesting that no particular function is associated with this domain.

The mode of action of Bax in plants and yeast remains to be determined, but we can hypothesize that Bax fortuitously activates a death pathway that is evolutionarily conserved, involving direct or indirect interactions with conserved regulatory proteins, that would be otherwise activated under physiological or pathological necessity. Bax and some other Bcl-2 family members exhibit a pore-forming activity (reviewed in Schendel *et al.*, 1998), and thus it can be speculated that Bax would act in plants through pore formation in the mitochondrial outer membrane via its C-terminal transmembrane domain, which is essential for Bax-induced cell death in plants (Lacomme and Santa Cruz, 1999; Kawai-Yamada *et al.*, 2001). Accordingly, pBI-1, located in the ER, could not act directly on mitochondria but rather on signaling molecules or pathways activated by mitochondrial perturbations. The ER is a calcium reservoir (Sanders *et al.*, 1999), and considering the hypothetical ion channel activity of BI-1 it could be implicated in the up-regulation or down-regulation of cytosolic calcium. The animal mitochondrion is thought to integrate various stresses, and under pathological conditions associated with increase in cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$ , cellular ATP depletion and oxidative stresses, mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  triggers opening of the mitochondrial permeability transition (MPT) pore, which lead to cytochrome *c* escape (Cai *et al.*, 1998; Crompton, 1999; Jones, 2000). In plants, there are several cases where calcium induces cell death when ATP pools are reduced (Jones, 2000),

and elevation of cytosolic free calcium is a common element of plant PCD signaling (Beers and McDowell, 2001). Further investigations regarding the role of calcium in the action of BI-1 in plants might reveal new insight into the regulation and execution of plant PCD.

### 2.2.7 Acknowledgements

We thank Dr. Guy Bellemare for the generous gift of the *B. napus* cDNA library and GFP clone, Dr. Richard Trelease for providing us with the BY-2 cell line, Dr. Dominick Pallotta for the yeast strain and plasmid pVT102U, Dr. Renée Bazin for clones of Bax and Bcl-2, and Drs. George Allen and Nina Allen for sharing the ER-BY-2 cell line. We also thank Dr. Hélène Chamberland for her valuable help with microscopy, and Antoine R. Tremblay and Isra el Fortin for helping with plasmid constructions and BY-2 cell maintenance. Finally, we thank Drs. André Darveau and Pierre-Mathieu Charest for critical reading of the manuscript and helpful discussions. This work was supported by grants from the NSERC (National Sciences and Engineering Research Council of Canada). N.B. was a recipient of NSERC and FCAR (Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies) fellowships.

### 2.2.8 References

- Amaravadi, L., & King, M.W. (1994) A rapid and efficient, nonradioactive method for screening recombinant DNA libraries. *Biotechniques* 16: 98-103.
- Aravind, L., Dixit, V.A., & Koonin, E.V. (2001) Apoptotic molecular machinery: vastly increased complexity in vertebrates revealed by genome comparisons. *Science* 291: 1279-1284.
- Beers, E.P., & McDowell, J.M. (2001) Regulation and execution of programmed cell death in response to pathogens, stress and developmental cues. *Curr Opin Plant Biol* 4: 561-567.

- Boevink, P., Santa Cruz, S., Hawes, C., Harris, N., & Oparka, K.J. (1996) Virus-mediated delivery of the green fluorescent protein to the endoplasmic reticulum of plant cells. *Plant J* 10: 935-941.
- Cai, J., Yang, J., & Jones, D.P. (1998) Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome *c*. *Biochim Biophys Acta* 1366: 139-149.
- Collings, D.A., Carter, C.N., Rink, J.C., Scott, A.C., Wyatt, S.E., & Allen, N.S. (2000) Plant nuclei can contain extensive grooves and invaginations. *Plant Cell* 12: 2425-2440.
- Crompton, M. (1999) The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 341: 233-249.
- Danon, A., Delorme, V., Mailhac, N., & Gallois, P. (2000) Plant programmed cell death: a common way to die. *Plant Physiol Biochem* 38: 647-655.
- 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: 6957-6962.
- Dingwall, C., & Laskey, R.A. (1991) Nuclear targeting sequences - a consensus? *Trends Biochem Sci* 16: 478-481.
- Dion, M., Chamberland, H., St-Michel, C., Plante, M., Darveau, A., Lafontaine, J.G., & Brisson, L.F. (1997) Detection of an homologue of bcl-2 in plant cells. *Biochem Cell Biol* 75: 457-461.
- Dunoyer, P., Ritzenthaler, C., Hemmer, O., Michler, P., & Fritsch, C. (2002) Intracellular localization of the peanut clump virus replication complex in tobacco BY-2 protoplasts containing green fluorescent protein-labeled endoplasmic reticulum or Golgi apparatus. *J Virol* 76: 865-874.
- Dyer, J.M., & Mullen, R.T. (2001) Immunocytological localization of two plant fatty acid desaturases in the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett* 494: 44-47.

- Gallagher, S.R. 1992. Gus protocols: using the gus gene as a reporter of gene expression. Academic Press, New York.
- Gallaher, B.W., Hille, R., Raile, K., & Kiess, W. (2001) Apoptosis: live or die - hard work either way! *Horm Metab Res* 33: 511-519.
- 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: 1325-1331.
- Gehrig, H.H., Winter, K., Cushman, J., Borland, A., & Taybi, T. (2000) An improved RNA isolation method for succulent plant species rich in polyphenols and polysaccharides. *Plant Mol Biol Rep* 18: 360-376.
- Greenberg, J.T. (1996) Programmed cell death: a way of life for plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 12094-12097.
- Hampton, R.Y., Koning, A., Wright, R., & Rine, J. (1996) *In vivo* examination of membrane protein localization and degradation with green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 828-833.
- 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: 739-748.
- Jones, A. (2000) Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death? *Trends Plant Sci* 5: 225-230.
- 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 yeast1. *FEBS Lett* 464: 143-147.
- 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: 12295-12300.

- 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: 613-621.
- Koizumi, N., Martinez, I.M., Kimata, Y., Kohno, K., Sano, H., & Chrispeels, M.J. (2001) Molecular characterization of two *Arabidopsis* Ire1 homologs, endoplasmic reticulum-located transmembrane protein kinases. *Plant Physiol* 127: 949-962.
- Kuo, W.N., McNabb, M., Kanadia, R.N., Dopson, N., & Morgan, R. (1997) The presence/absence of Bcl-2, Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependant protein kinase IV, calretinin and p53 in baker's yeast and wheat germ. *Cytobios* 91: 7-13.
- 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: 7956-7961.
- Mitsuhara, I., Malik, K.A., Miura, M., & Ohashi, Y. (1999) Animal cell-death suppressors Bcl-X<sub>L</sub> and Ced-9 inhibit cell death in tobacco plants. *Curr Biol* 9: 775-778.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.
- Page, R.D. (1996) TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 12: 357-358.
- Pennell, R.I., & Lamb, C. (1997) Programmed cell death in plants. *Plant Cell* 9: 1157-1168.
- Preuss, D., Mulholland, J., Kaiser, C.A., Orlean, P., Albright, C., Rose, M.D., Robbins, P.W., & Botstein, D. (1991) Structure of the yeast endoplasmic reticulum: localization of ER proteins using immunofluorescence and immunoelectron microscopy. *Yeast* 7: 891-911.
- Rose, M.D., Misra, L.M., & Vogel, J.P. (1989) KAR2, a karyogamy gene, is the yeast homolog of the mammalian BiP/GRP78 gene. *Cell* 57: 1211-1221.

- Rubino, L., Weber-Lotfi, F., Dietrich, A., Stussi-Garaud, 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: 303-318.
- 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: 393-399.
- Sanders, D., Brownlee, C., & Harper, J.F. (1999) Communicating with calcium. *Plant Cell* 11: 691-706.
- Schendel, S.L., Montal, M., & Reed, J.C. (1998) Bcl-2 family proteins as ion-channels. *Cell Death Differ* 5: 372-380.
- Shirasu, K., & Schulze-Lefert, P. (2000) Regulators of cell death in disease resistance. *Plant Mol Biol* 44: 371-385.
- 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: 4876-4882.
- Trelease, R.N., Lee, M.S., Banjoko, A., & Bunkelmann, J. (1996) C-terminal polypeptides are necessary and sufficient for *in vivo* targeting of transiently-expressed proteins to peroxisomes in suspension-cultured plant cells. *Protoplasma* 195: 156-167.
- Vaux, D.L., & Korsmeyer, S.J. (1999) Cell death in development. *Cell* 96: 245-254.
- Vernet, T., Dignard, D., & Thomas, D.Y. (1987) A family of yeast expression vectors containing the phage F1 intergenic region. *Gene* 52: 225-233.
- Xu, Q., Jürgensmeier, J.M., & Reed, J.C. (1999) Methods of assaying Bcl-2 and Bax family proteins in yeast. *Methods* 17: 292-304.

- Xu, Q., & Reed, J.C. (1998) Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast. *Mol Cell* 1: 337-346.
- 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: 308-312.
- Zha, H., Fisk, H.A., Yaffe, M.P., Mahajan, N., Herman, B., & Reed, J.C. (1996) Structure-function comparisons of the proapoptotic protein Bax in yeast and mammalian cells. *Mol Cell Biol* 16: 6494-6508.

## **CHAPITRE 3**

**Analyse fonctionnelle du rôle anti-PCD de NtBI-1 dans  
des cellules végétales**

### **3 La répression de NtBI-1 dans des cellules BY-2 de tabac *via* un messenger antisens induit une accélération de la mort cellulaire en l'absence d'une source de carbone.**

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication dans la revue *FEBS Lett* (532 (1-2), pp. 111-114) et constitue la version finale telle que publiée dans ce journal. Ce travail est reproduit ici avec la permission du journal. Cet article a été écrit suite à mes travaux et j'ai produit toutes les figures. J'ai structuré et écrit la première version de cet article en collaboration avec ma co-auteure et directrice de travaux et j'ai préparé la version finale de la publication.

### 3.1 Résumé

Il a été proposé que la protéine Bax Inhibitor-1 (BI-1) pourrait être un suppresseur évolutivement conservé de la mort cellulaire programmée. Nous investigons ici la fonction anti-apoptotique d'un BI-1 végétal par l'utilisation d'un ARNm antisens (AS) pour atténuer l'expression de NtBI-1 dans des cultures cellulaires de *Nicotiana tabacum* cv. BY-2. Nous avons observé que les lignées AS sont plus susceptibles à l'autophagie, à la fragmentation internucléosomale de l'ADN et à la mort que les cellules témoins lorsqu'elles sont soumises à une diète pauvre en sucrose ou à un choc hypo-osmotique, ce qui confirme le rôle d'inhibiteur de mort de BI-1 dans les cellules végétales.

## 3.2 Article

### **Antisense down regulation of NtBI-1 in tobacco BY-2 cells induces accelerated cell death upon carbon starvation**

**Nathalie Bolduc and Louise F. Brisson**

Department of Biochemistry and Microbiology, Life and Health Science Pavilion, Laval University, Quebec, QC, Canada G1K 7P4

E-mail: [louise.brisson@rsvs.ulaval.ca](mailto:louise.brisson@rsvs.ulaval.ca)

Fax: 1-418-6567176

### 3.2.1 Abstract

Bax inhibitor-1 (BI-1) protein is proposed to be a conserved programmed cell death suppressor. In this report, we investigate the anti-apoptotic function of plant BI-1 by antisense (AS) down regulation of NtBI-1 in *Nicotiana tabacum* cv. BY-2 cells. We observed that AS cell lines are more susceptible to autophagy, internucleosomal DNA fragmentation and death than control cells when subjected to sucrose starvation and hypo-osmotic shock, in agreement with a role of BI-1 as a death inhibitor.

### 3.2.2 Footnotes

**Keywords** : Bax inhibitor-1; Programmed cell death; DNA fragmentation; Plant; Autophagy.

**Abbreviations** : AS, antisense; Suc, sucrose; Man, mannitol; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling; PCD, programmed cell death; (p, h)BI-1, (plant, human)Bax inhibitor-1; GUS,  $\beta$ -glucuronidase.

### 3.2.3 Introduction

In higher eukaryotes, programmed cell death (PCD) is a normal part of life, playing important roles in many diverse physiological processes, from development to stress responses. While this phenomenon is relatively well understood in animals, our comprehension of plant PCD is only emerging. In mammals, apoptosis is prominently controlled through functionally conserved proteins of the Bcl-2 family, including members that promote cell survival (e.g. Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>) and cell death (e.g. Bax, Bak; Gallaher *et al.*, 2001). To date, no such genes have been identified in plants, but much evidence argues for the existence of evolutionarily conserved pathways for the control and execution of PCD in both plants and animals (Danon *et al.*, 2000).

Among evolutionarily conserved PCD actors figures Bax inhibitor-1 (hBI-1), which was first identified in a human cDNA library from its ability to suppress Bax-induced cell death in yeast (Xu and Reed, 1998). hBI-1 also inhibits death induced either by the overexpression of Bax in human HEK293 cells (although not by direct protein–protein interaction) or by other pro-apoptotic stimuli (Xu and Reed, 1998). After the original identification of hBI-1, plant homologues (pBI-1) have been cloned from a number of genera (Kawai *et al.*, 1999; Sanchez *et al.*, 2000; Hüchelhoven *et al.*, 2001; Bolduc *et al.*, 2003), and pBI-1 from *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* (respectively AtBI-1 and OsBI-1) can suppress Bax-induced lethality in yeast (Kawai *et al.*, 1999; Sanchez *et al.*, 2000). Lethality induced by the ectopic expression of Bax in *A. thaliana* can also be suppressed by AtBI-1 (Kawai-Yamada *et al.*, 2001). Moreover, it has been shown that NtBI-1 and BnBI-1 (from *Nicotiana tabacum* and *Brassica napus*) could suppress Bax-induced lethality in human HEK293 cells (Bolduc *et al.*, 2003), although it has been reported that AtBI-1 induces death when expressed in human HT1080 cells (Yu *et al.*, 2002). Thus, it appears that BI-1 could be a participating actor of an evolutionarily conserved cell death pathway.

Both plant and animal BI-1 are mainly located in membranes of endoplasmic reticulum and the nuclear envelope (Xu and Reed, 1998; Bolduc *et al.*, 2003; Bolduc *et al.*, 2003). In plants, pBI-1 seems relatively ubiquitous in all organs (Sanchez *et al.*, 2000; Bolduc *et al.*,

2003), and higher accumulations have been observed in flowers undergoing senescence (Bolduc *et al.*, 2003) or in leaves following wounding or pathogen attack (Sanchez *et al.*, 2000). However, its precise physiological function in plants remains to be determined, since no sequence homologues of *Bax* have been identified to date. Considering that antisense (AS) down regulation of hBI-1 induces apoptosis (Xu and Reed, 1998), we wondered whether it would be the case in plants. We thus report here the effects of constitutive AS down regulation of NtBI-1 in tobacco BY-2 cells.

### 3.2.4 Materials and methods

#### 3.2.4.1 Generation of AS cell lines

Cell suspension cultures of *N. tabacum* cv. BY-2 were cultured as described (Bolduc *et al.*, 2003). A pBI121 vector carrying the *NtBI-1* cDNA in AS orientation was constructed using primers Nt4 (5'-CTTGTTCAAGTTCGAGGAGCTCGATT) containing a *Sst*I site and Nt5 (5'-TTCACCTCGAGAACAAGAAAATGCCAG) to amplify the entire coding region of *NtBI-1* from plasmid pBSK-NtBI-1 (Bolduc *et al.*, 2003). The PCR product was then subcloned in the *Xba*I and *Sst*I sites of pBI121. The proper orientation of the AS construct was confirmed by automatic sequencing. This construct, together with the original pBI121 vector, was then used to achieve *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation as described (Bolduc *et al.*, 2003) for the generation of AS or  $\beta$ -glucuronidase (GUS) stable transformed cell lines.

#### 3.2.4.2 Immunoblot analysis

BY-2 cells were ground in liquid N<sub>2</sub> and boiled in lysis buffer (0.1 M Tris-HCl pH 6.8, 5% sodium dodecyl sulfate (SDS), 20% glycerol, 5 mM EDTA, 70 mM 2-mercaptoethanol) for 10 min before being centrifuged (10000×g, 5 min). Supernatants were collected and protein contents were determined (Peterson, 1977). Separation of proteins (50  $\mu$ g per lane) into SDS-12% polyacrylamide gels, transfer to polyvinylidene difluoride membranes and immunodetection were performed according to standard procedures.

Polyclonal anti-pBI-1 antibodies were generated in rabbit using a synthetic peptide corresponding to the C-terminal end of AtBI-1 protein conjugated to keyhole limpet hemocyanin (KLH) by its N-terminal extremity (a cysteine was added for conjugation purposes; KLH-CKNSADKKEEKKKKRRN). Serum was used at dilution 1:800. Bound antibodies were detected with a goat anti-rabbit IgG (horseradish peroxidase conjugated) and a chemiluminescent substrate (BM Chemiluminescence Blotting Substrate, Roche Molecular Biochemicals). Labeling specificity was confirmed by a drastic signal reduction following preadsorption of the antibodies to the synthetic peptide.

#### **3.2.4.3 Sucrose starvation and cell death assays**

Four-day-old, logarithmically growing cells were allowed to settle and washed with phosphate buffered saline (PBS) before being resuspended in either the original volume of standard growing medium [containing 3% sucrose (suc)], medium without suc or medium without suc supplemented with 2% mannitol as an osmoticum (man medium). The percentage of dead cells was determined using Evans blue as described (Delledonne *et al.*, 2001).

#### **3.2.4.4 DNA fragmentation analysis**

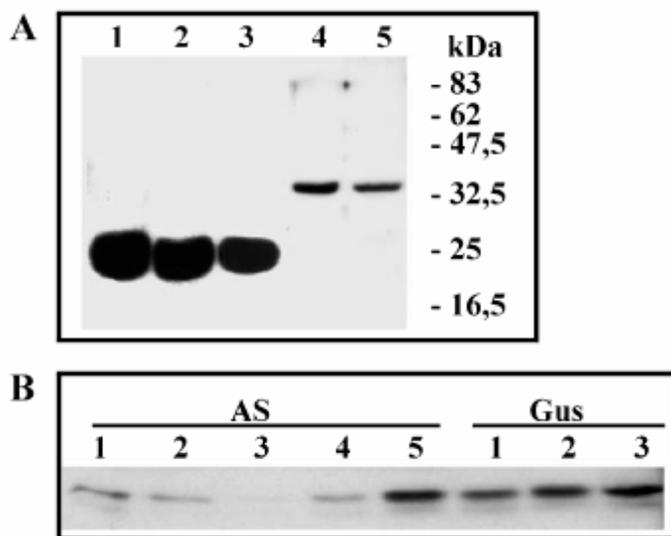
For terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) assays, cells were fixed in 4% paraformaldehyde (in PBS) at room temperature for 45 min, washed and digested in PBS containing 0.1% pectolyase and 8 mM MgSO<sub>4</sub> for 2 h at 30°C. Digested cells were spread on microscope slides, air dried overnight and subjected to TUNEL using fluorescein-dUTP according to the manufacturer's instructions (ApoAlert<sup>®</sup> DNA Fragmentation Assay Kit, Clontech), except that membranes were permeabilized using 0.5% Triton X-100. Nuclei were counterstained with 0.5 µg/ml propidium iodide (PI) and visualized under confocal laser scanning microscopy using a Zeiss LSM310 instrument.

For DNA isolation, cells were ground in liquid N<sub>2</sub> and approximately 200 mg were incubated in 750 µl CTAB buffer [2% CTAB (hexadecyltrimethyl ammonium bromide), 1.4 M NaCl, 0.2% β-mercaptoethanol, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8] at 65°C for 30 min in 1.5 ml tubes. Subsequently, one volume of chloroform:isoamyl alcohol (24:1) was added and the samples were gently agitated at room temperature for 10 min and centrifuged (1600×g, 5 min). The aqueous phase was collected, mixed with 0.66 volume of isopropanol and centrifuged (3000×g, 5 min). Pellets were resuspended in 400 µl RNase buffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 50 µg/ml RNase A) and incubated at 37°C for 30 min. DNA was ethanol precipitated, air dried, resuspended in 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA and separated by electrophoresing 2 µg/lane on 1.5% agarose gel.

### 3.2.5 Results and discussion

#### 3.2.5.1 Generation of AS cell lines and NtBI-1 analysis

To investigate the *in vivo* functions of BI-1 in plants, we transformed tobacco BY-2 cells either with a construction harboring the *NtBI-1* gene in the AS orientation or with the *GUS* gene, both under the control of the constitutive CaMV 35S promoter. Five different AS stable cell lines were used throughout this study and compared to three different GUS cell lines (controls). Levels of NtBI-1 protein were monitored with polyclonal anti-pBI-1 antibodies that specifically recognize a single band of the expected apparent molecular weight ( $M_r$ ) for pBI-1, i.e. approximately 28 kDa, in leaf extracts of *N. tabacum*, *A. thaliana* or *B. napus* (Figure 3-1A). Intriguingly, an  $M_r$  of 33 kDa was observed in cultured tobacco cells of all tested cultivars (BY-2 and Xanthi, Figure 3-1A; SR-1, data not shown). Since the length of *NtBI-1* mRNA is the same whatever its origin (Bolduc *et al.*, 2003), post-translational modifications should occur in cultured cells. In our experiments, the  $M_r$  of NtBI-1 remained unchanged upon deglycosylation experiments with BY-2 protein extracts (data not shown), leaving questionable the nature of the post-translational modification.



**Figure 3-1 : Immunodetection of pBI-1 in plant leaves and cultured cells.**

**A)** Basal expression of pBI-1 in leaves of *A. thaliana* ecotype Columbia (1), *N. tabacum* cv. Xanthi (2) or *B. napus* cv. Westar (3) and in cultured cells of *N. tabacum* cvs. BY-2 (4) and Xanthi (5). **B)** NtBI-1 levels in different AS and control cell lines.

AS cell lines exhibited low levels of NtBI-1 when compared to controls (Figure 3-1B). However, NtBI-1 levels in AS lines were relatively variable from week to week. As an example, line AS5 had the lowest NtBI-1 level when we started our experiments (data not shown), but was found to exhibit the highest thereafter (Figure 3-1B). Thus, in order to get representative results, we conducted our experiments using different lines at a time rather than a single one.

### 3.2.5.2 Observation of AS cell lines under standard growing conditions

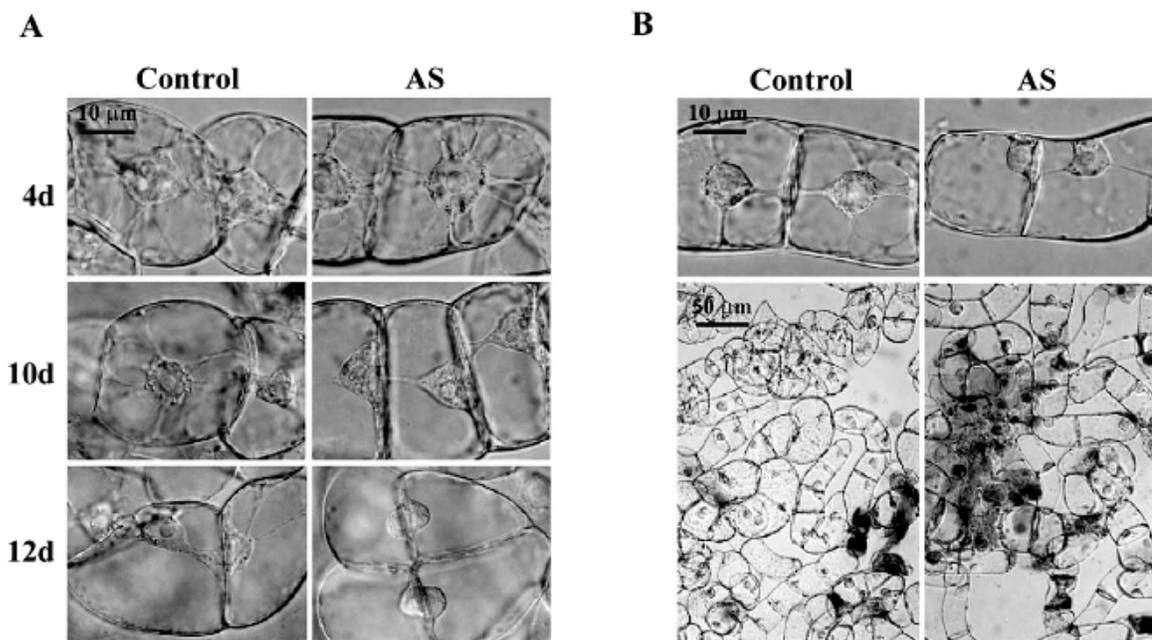
Observation of AS lines in the exponentially growing phase allowed the visualization of a normal morphology (Figure 3-2A). Their growth rates were also comparable to those of control cell lines (data not shown). However, with the aging of cultures (i.e. 9–14 days after the transfer to fresh medium), AS lines became slowly grayish, while control lines maintained their usual light yellow color (not shown). Furthermore, in the majority of AS cells, a number of morphological changes were observable (Figure 3-2A), including a

drastic reduction (10 days) to a complete disappearance (12 days) in the number of transvacuolar strands and the confinement of the cytoplasm just beneath the plasma membrane and the perinuclear region. Such morphology was only observed in a small proportion of control cells, particularly in older cells (12 days or more), the majority being relatively normal or presenting a reduced number of transvacuolar strands. These morphological features are closely related to those reported for BY-2 cells undergoing autophagy in response to suc starvation (Moriyasu and Ohsumi, 1996). BY-2 cells are heterotrophic and thus depend on their growing medium to supply them with a carbon source. In aged cultures, growing medium was depleted of its sucrose content, and therefore we can speculate from our observations that AS lines are more sensitive to carbon starvation than control cells.

### **3.2.5.3 Observation of AS cell lines under carbon starvation**

#### **3.2.5.3.1 Evaluation of mortality**

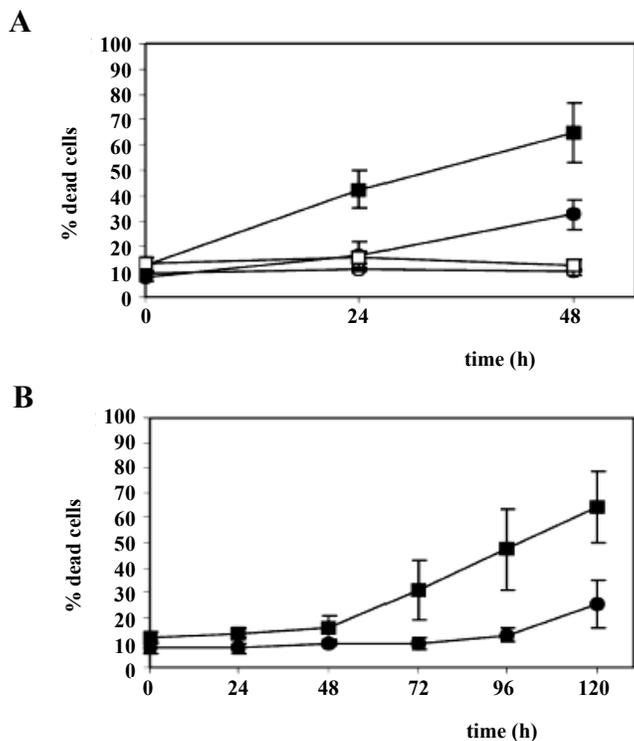
To confirm and quantify the relation between autophagy and NtBI-1 level, exponentially growing AS and control cells were transferred to suc-free growing medium or fresh medium and progression of mortality was followed over time (Figure 3-3A). As expected, the percentage of dead cells remained low for both AS and control cells transferred to fresh medium, but it reached over 30% for control and 60% for AS cell lines (after 48 h) when transferring cells to suc-free medium. These data indicate an inverse correlation between levels of NtBI-1 and cell death. However, transfer of plant cells to suc-free medium triggers not only a nutrient stress but a hypo-osmotic shock as well. Interestingly, we observed that AS lines presented a higher proportion of dehydrated cells than control lines following transfer to suc-free medium (data not shown). This observation raised the hypothesis that increased death of AS lines could be partly or completely attributable to an increased susceptibility to hypo-osmotic shock.



**Figure 3-2** : Representative fields showing the effects of NtBI-1 down regulation on tobacco BY-2 cell morphology.

**A)** Time course observations of AS and control cells growing under standard conditions 4-12 days after the weekly transfer to fresh medium. **B)** Observations 96 h after transfer to man medium. Cells in the lower panel were photographed in the presence of 0.05% Evan's blue.

In an attempt to discriminate carbon starvation from hypo-osmotic shock, cells were transferred to man medium, an osmoticum commonly used because it is very slowly taken up by plant cells (Stoop and Pharr, 1993). In these conditions, no appreciable increase in control cell's mortality was observed until 120 h after the transfer (25%, Figure 3-3B), which is similar to data reported for carrot (*Daucus carota* L.) suspension cells subjected to the same carbon starvation conditions (Chae and Lee, 2001). On the other hand, mortality of AS cell lines started earlier than control cells, i.e. 72 h after transfer (over 30%), to reach over 60% after 120 h (Figure 3-3B). These data clearly show that carbon starvation can be sufficient to promote cell death in AS lines.



**Figure 3-3 : Death assessment in AS and control cell lines upon suc starvation.**

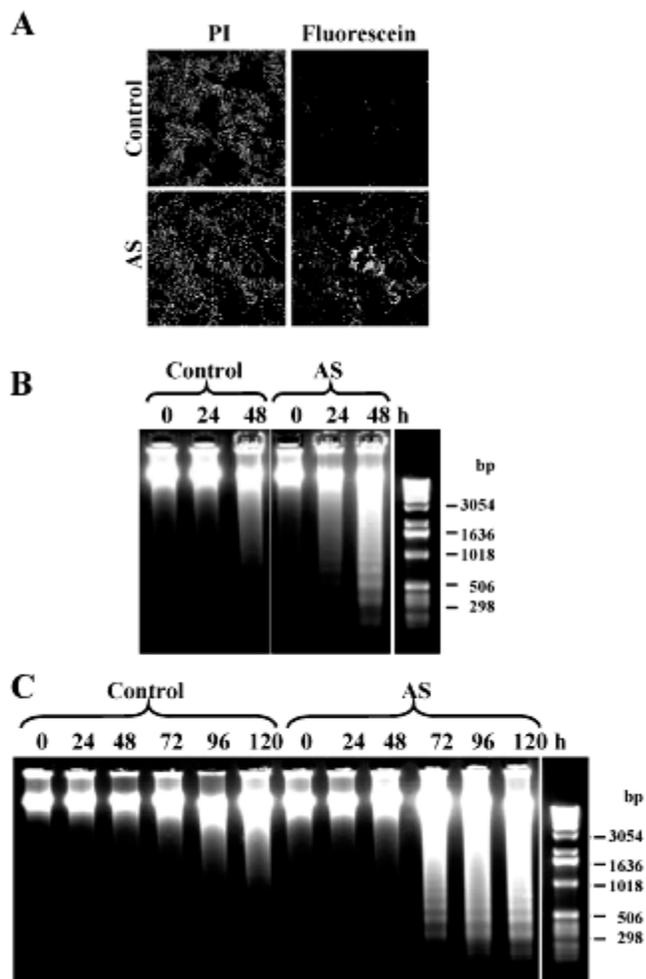
AS (■, □) and control (●, ○) cells were transferred to suc-free (■, ●) and fresh (□, ○) media in the absence (A) or presence (B) of man. Data are the mean values ( $\pm$ S.D.) of three independent experiments using all control lines and AS lines 1–4.

Observations of cells under light microscopy 96 h after transfer to man medium in the presence of Evan's blue to visualize dead cells (Figure 3-2B) confirmed that a large proportion of AS cells were already dead by this time, while most control cells remained able to exclude the stain. Moreover, AS cells showed morphological features characteristic of autophagy, with almost complete disappearance of the cytoplasm, while control cells remained relatively normal, exhibiting only a reduced number of transvacuolar strands. Similar morphological differences between AS and control cells were observed when cells were transferred to suc-free medium (data not shown), except that the phenomenon was accelerated and dehydrated cells were frequently observed in AS cells. Taken all together, these data clearly indicate that BY-2 cells expressing a low level of NtBI-1 die prematurely upon carbon starvation or a combination of carbon starvation and hypo-osmotic shock. This is further confirmed by the unstable behavior of line AS5, which, following transformation,

exhibited a very low level of NtBI-1, together with a high percentage of cell death (data not shown). However, after 6 months of culture, we observed that these cells displayed a higher NtBI-1 content (Figure 3-1B), and presented only 30% of dead cells after 120 h in man medium (data not shown). This clearly illustrates that mortality correlates with the NtBI-1 level and is not attributable to the transformation procedure.

### **3.2.5.3.2 DNA fragmentation analysis**

To determine whether death in AS lines could be associated with PCD, we investigated the occurrence of internucleosomal degradation of nuclear DNA, a typical biochemical marker of some forms of PCD. Nuclear degradation was first analyzed by a TUNEL assay on cells harvested 48 h after transfer to suc-free medium. As seen in Figure 3-4A, DNA was poorly labeled in control cells, while a large proportion of cells from AS lines were TUNEL positive. To further confirm the internucleosomal DNA cleavage characteristic of PCD, DNA isolated from cells cultured under suc starvation was subjected to agarose gel electrophoresis (Figure 3-4B,C). For both treatments ( $\pm 2\%$  man), a DNA laddering could be observed in AS lines but not in control lines within the time frame under study. Moreover, the first appearance of DNA laddering in AS lines correlated with an increased cell death, i.e. 24 h (without man) or 72 h (with man; Figure 3-3). In the case of line AS5, which failed to present a significant increase in cell death, no DNA laddering could be observed (data not shown). Taken all together, our data clearly establish a direct correlation between accelerated cell death, internucleosomal DNA degradation and low levels of NtBI-1.



**Figure 3-4 : DNA fragmentation analysis in AS and control cell lines following transfer to suc-free or man medium.**

**A)** TUNEL assay on cells harvested 48 h after transfer to suc-free medium. **B-C)** Time course analysis of internucleosomal DNA fragmentation following transfer to suc-free (**B**) or man medium (**C**). Typical data from AS lines 1–4 and control lines 1–3 are presented.

### 3.2.6 Concluding remarks

The physiological function of BI-1 in plant cells is still unclear. In this paper, we have demonstrated that AS down regulation of the *NtBI-1* gene in tobacco BY-2 cells affects cell viability and prematurely induces internucleosomal degradation of nuclear DNA when these cells are subjected to stresses such as carbon starvation and hypo-osmotic shock. These observations, which correlate with those reported for AS suppression of the *hBI-1* gene in human cells (Xu and Reed, 1998), confirm the anti-apoptotic role of pBI-1 in plants, and suggest its potential implication in the regulation of autophagy. Interestingly, it has been previously reported that hBI-1 suppressed apoptosis induced by a number of pro-apoptotic stimuli, including growth factor deprivation (Xu and Reed, 1998), suggesting a similar role in mammals. At the plant level, *AtBI-1* mRNA accumulation was delayed in *A. thaliana coi1* mutants compared to wild type (Sanchez *et al.*, 2000), and the authors suggested that reduced AtBI-1 levels may contribute to the enhanced susceptibility shown by *coi1* plants to infections by various fungal pathogens. These data together with all available information on pBI-1 (Sanchez *et al.*, 2000; Hüchelhoven *et al.*, 2001; Bolduc *et al.*, 2003) strongly indicate that pBI-1 may have a ubiquitous role in responses to biotic and abiotic stress and thus would play a general protective role against significant metabolic perturbations, as previously suggested (Sanchez *et al.*, 2000). However, the elucidation of molecular mechanisms underlying this protective effect will need further investigations.

### 3.2.7 Acknowledgements

We would like to thank Dr. Richard Trelease for the BY-2 cell line. We also gratefully thank Mario Ouellet, Marie-Nathalie Martineau, Damien Carignan, Antoine R. Tremblay and Israël Fortin for technical assistance. This work was supported by grants from the NSERC (National Sciences and Engineering Research Council of Canada). N.B. was a recipient of NSERC and FCAR (Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies) fellowships.

### 3.2.8 References

- 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: 377-386.
- Chae, H.S., & Lee, W.S. (2001) Ethylene- and enzyme-mediated superoxide production and cell death in carrot cells grown under carbon starvation. *Plant Cell Rep* 20: 256-261.
- Danon, A., Delorme, V., Mailhac, N., & Gallois, P. (2000) Plant programmed cell death: a common way to die. *Plant Physiol Biochem* 38: 647-655.
- 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: 13454-13459.
- Gallaher, B.W., Hille, R., Raile, K., & Kiess, W. (2001) Apoptosis: live or die - hard work either way! *Horm Metab Res* 33: 511-519.
- 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: 739-748.
- 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: 143-147.
- 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: 12295-12300.
- Moriyasu, Y., & Ohsumi, Y. (1996) Autophagy in tobacco suspension-cultured cells in response to sucrose starvation. *Plant Physiol* 111: 1233-1241.

- Peterson, G.L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83: 346-356.
- 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: 393-399.
- Stoop, J., & Pharr, D.M. (1993) Effect of different carbon sources on relative growth rate, internal carbohydrates, and mannitol 1-oxidoreductase activity in celery suspension cultures. *Plant Physiol* 103: 1001-1008.
- Xu, Q., & Reed, J.C. (1998) Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast. *Mol Cell* 1: 337-346.
- 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: 308-312.

## **CHAPITRE 4**

**Effets des cytokinines et du  $\text{Ca}^{2+}$  sur l'expression de BI-1  
dans des cultures cellulaires de tabac**

## **4 L'accumulation du régulateur négatif de la mort cellulaire programmée Bax Inhibitor-1 est favorisée par les cytokinines dans des cellules de *Nicotiana tabacum***

Ce chapitre, qui a été soumis pour publication, a été écrit suite à mes travaux et j'ai ainsi préparé toutes les figures à l'exception de la Figure 4-5 et de la Figure 4-6A. Ces dernières proviennent de travaux effectués par le deuxième auteur alors qu'il était sous la supervision du troisième auteur et ce sont eux qui m'ont fourni ces deux figures. J'ai structuré et écrit entièrement cette première version de l'article.

## 4.1 Résumé

La mort cellulaire programmée (PCD) est un phénomène vital pour les organismes multicellulaires y compris les végétaux. À ce jour, les processus biochimiques impliqués dans le contrôle de la PCD végétale demeurent obscurs. La protéine Bax Inhibitor-1 (BI-1) est conservée entre les animaux et les végétaux et agit au sein des deux règnes en tant que régulateur négatif de la PCD par un mécanisme encore inconnu. Dans le but d'élucider la façon dont cette protéine est régulée et agit, nous avons utilisé des suspensions cellulaires de *Nicotiana tabacum* pour y étudier les effets d'apports exogènes de cytokinines (CK) sur l'accumulation de NtBI-1 *via* immunobuvardage. Nous avons découvert que NtBI-1 est induit suite à une exposition envers les CK, et ce à des concentrations permettant l'établissement d'une réponse de stress (évaluée par une réduction sévère de la croissance et l'induction de *PR1a*), mais non à des concentrations induisant la PCD. L'accumulation de la protéine augmente sans modulation de l'accumulation de l'ARNm, indiquant l'implication de mécanismes de régulation post-transcriptionnels. La surexpression de NtBI-1 est modifiée quand la phosphorylation intracellulaire du 6-benzylaminopurine (Bap), une étape critique dans l'induction de la PCD par la phytohormone, est inhibée par l'utilisation d'un inhibiteur de l'adénosine kinase. De plus, la surexpression de NtBI-1 induite par le Bap nécessite une exposition suffisamment longue pour induire la réponse de stress. L'ajout de Bap est aussi accompagné d'un influx rapide de  $\text{Ca}^{2+}$  de l'apoplaste vers le cytosol, et ce dans l'intervalle de concentration menant au stress et à la PCD et l'inhibition de l'influx par le  $\text{La}^{3+}$  rétablit partiellement la viabilité. Cependant, l'accumulation de NtBI-1 n'est pas influencée par cet influx de  $\text{Ca}^{2+}$  ni par aucun agent connu pour altérer l'homéostasie intracellulaire du  $\text{Ca}^{2+}$ , suggérant que la régulation du niveau de la protéine n'est pas sensible à la signalisation par le  $\text{Ca}^{2+}$ . Nos données indiquent un rôle pour NtBI-1 dans la réponse de stress envers les CK et suggèrent l'implication de cette protéine dans l'activité anti-sénescence de cette phytohormone.

## 4.2 Article

**The negative programmed cell death regulator Bax Inhibitor-1 is up-regulated by cytokinins in *Nicotiana tabacum* cells**

**Nathalie Bolduc<sup>a</sup>, Gregory N. Lamb<sup>b</sup>, Stephen G. Cessna<sup>b</sup> and Louise F. Brisson<sup>a,1</sup>**

<sup>a</sup> Département de Biochimie et de Microbiologie, Université Laval, Québec, Qc, Canada, G1K 7P4

<sup>b</sup> Department of Chemistry and Biochemistry, Eastern Mennonite University, 1200 Park Rd, Harrisonburg, VA 22802, USA

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed. E-mail: [louise.brisson@rsvs.ulaval.ca](mailto:louise.brisson@rsvs.ulaval.ca); fax 1-418-6567176

### 4.2.1 Abstract

Programmed cell death (PCD) is a vital phenomenon for multicellular organisms including plants. To date, biochemical processes involved in the control of plant PCD are only poorly understood. The protein Bax Inhibitor-1 (BI-1) is conserved between animals and plants and acts in both kingdoms as a negative regulator of PCD by an unknown mechanism. To elucidate its regulation and mode of action, we used suspension cells of *Nicotiana tabacum* to study the effects of cytokinins (CKs) on the expression level of the protein NtBI-1 via western analysis. We found that NtBI-1 is up-regulated following treatments with CKs at concentrations inducing a stress response (as determined by severe growth reduction and *PR1a* induction), but not at PCD-inducing concentrations. Interestingly, the level of the protein increased without modulation of its mRNA, indicative of a post-transcriptional mechanism. NtBI-1 protein up-regulation was altered when the intracellular phosphorylation of the CK 6-benzylaminopurine (Bap), a critical step for the Bap -induced cell death, was inhibited by the use of an adenosine kinase inhibitor. Moreover, Bap-induced NtBI-1 up-regulation required an exposure time sufficient to induce a stress response. Application of Bap was accompanied by a rapid cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  pulse, and inhibition of this pulse with  $\text{La}^{3+}$  partially restored viability. However, CK-induced NtBI-1 accumulation was not altered by prior  $\text{La}^{3+}$  treatment, or by treatment with several other modulators of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and signaling, suggesting that CK-dependent regulation of the NtBI-1 protein accumulation is not mediated by  $\text{Ca}^{2+}$  signaling. Our data point toward a role for NtBI-1 in the stress response to CKs and open the possibility of its involvement in their senescence-delay activity.

### 4.2.2 Footnotes

**Keywords:** Programmed cell death; Bax Inhibitor-1;  $\text{Ca}^{2+}$ ; Stress; Cytokinins; Aequorin.

**Abbreviations:** PCD, programmed cell death; NtBI-1, *Nicotiana tabacum* Bax Inhibitor-1; Bap, 6-benzylaminopurine; iP,  $\text{N}^6$ -(2-isopentenyl)adenine; iPA,  $\text{N}^6$ -(2-isopentenyl) adenosine; Kin, kinetin; Zea, zeatin; Adk, adenosine kinase; AdkI, adenosine kinase inhibitor; JA, jasmonic acid; ABA, abscisic acid; SA, salicylic acid; ER, endoplasmic reticulum; CK, cytokinin; CKX, cytokinin oxidase/deshydrogenase; VDCC, voltage-dependent calcium channel. Cyt $c$ , cytochrome  $c$ ; DPT, days post transfer.

### 4.2.3 Introduction

Programmed cell death (PCD) is a sophisticated physiological process evolved by eukaryotes to remove unwanted, damaged or infected cells in the course of normal development or under pathological situations, with the aim of maintaining the integrity or fitness of the remaining organism or cell population (Gallaher *et al.*, 2001). In plants, the proper occurrence of a PCD program is essential for the establishment of the hypersensitive response (HR) following pathogen attack, and the formation of xylem vessels, root aerenchyma, pollen grains, endosperm, etc. Senescence is also a form of PCD involving whole organs such as leaves, petals and fruits, and even the whole plant body (Hoeberichts and Woltering, 2003).

Plant PCD is less documented than animal PCD. However, actual knowledge indicates that some biochemical pathways could be conserved between kingdoms, such as the involvement of reactive oxygen species (ROS), the release of cytochrome  $c$  (Cyt $c$ ) from mitochondria and signal transduction by  $\text{Ca}^{2+}$  fluxes (Hoeberichts and Woltering, 2003). Although some morphological similarities with animal apoptosis have been observed in plant PCD, such as cytoplasmic shrinkage and internucleosomal DNA fragmentation, plants mostly rely on their vacuole to undergo PCD (Butler and Simon, 1971; Jones, 2001),

reminiscent of lysosomal/autophagic cell death in animal development (Lockshin and Zakeri, 2004).

On the other hand, while animal apoptosis is regulated by well characterized pro- and anti-apoptotic regulatory members of the Bcl-2 family, most plant PCD regulators are to be discovered, and Bcl-2-related genes have no sequence homologues in plants (Aravind *et al.*, 2001; Lam *et al.*, 2001). In animals, Bcl-2 regulates PCD by interacting with structurally similar proteins of the Bcl-2 family, such as Bax, an important inducer of PCD. These proteins act mainly by interference with proteases (caspases) activation through their effect on mitochondrial membrane integrity or endoplasmic reticulum (ER)  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis (Orrenius *et al.*, 2003). Bax Inhibitor-1 (BI-1), a negative regulator of apoptosis in mammals (Xu and Reed, 1998), has recently emerged as an evolutionary conserved negative regulator of plant PCD (reviewed by Hüchelhoven, 2004). Similar to Bcl-2, BI-1 is targeted to membranes (mainly the ER) and its sequence analysis suggests the presence of seven putative transmembrane domains (Xu and Reed, 1998; Bolduc *et al.*, 2003). Human BI-1 has been originally shown to suppress Bax-induced cell death in yeast and human cells (Xu and Reed, 1998). Numerous plant homologues were subsequently identified, sharing not only high sequence identity but also functionality. Effectively, plant BI-1 can counteract Bax in yeast (Kawai *et al.*, 1999; Sanchez *et al.*, 2000), in human HEK cells (Bolduc *et al.*, 2003) and in *Arabidopsis thaliana* (Kawai-Yamada *et al.*, 2001). Although BI-1 is a negative regulator of plant PCD (Bolduc and Brisson, 2002; Hüchelhoven *et al.*, 2003; Matsumura *et al.*, 2003; Kawai-Yamada *et al.*, 2004), its mode of action remains unknown. However, a recent investigation by Chae and co-workers (2004) indicates that in mouse, BI-1 could act by lowering the amount of releasable  $\text{Ca}^{2+}$  from the ER, as similarly demonstrated for Bcl-2 (Orrenius *et al.*, 2003).

As many aspects of plant development involve PCD, it is not surprising that hormones affect PCD regulation, specifically those generally associated with stresses, namely salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA), abscisic acid (ABA) and ethylene (Hoeberichts and Woltering, 2003; Overmyer *et al.*, 2003). Cytokinins (CKs), a structurally diverse group of  $\text{N}^6$ -substituted purine derivatives, are also traditionally recognized as anti-PCD hormones, principally because they promote growth and differentiation, and delay senescence.

Effectively, their level declines during senescence, and exogenous application of this hormone or overexpression of the bacterial CK biosynthetic enzyme isopentenyl transferase (*ipt*) favors delayed leaf senescence (Mok, 1994). However, such a view has been recently challenged by the occurrence of CK-induced PCD in suspension cells of *A. thaliana*, *Daucus carota* and *Nicotiana tabacum* (Mlejnek and Procházka, 2002; Carimi *et al.*, 2003; Mlejnek *et al.*, 2003; Carimi *et al.*, 2004). This PCD was characterized by the occurrence of internucleosomal DNA fragmentation and potential involvement of mitochondria.

Although the molecular mechanisms underlying this phenomenon remain obscure, toxicity associated with high levels of CKs in plant tissues (due to exogenous application or increased accumulation of the hormone in transgenic plants expressing *ipt*) has also been reported episodically (Ainley *et al.*, 1993; Martineau *et al.*, 1994; McCabe *et al.*, 2001; Rakwal *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004). It is not clear whether this CK's effect is chemical rather than hormonal, since adenine and adenosine derivatives with CK activities are efficient apoptosis inducers in animal cells (Mlejnek and Kuglik, 2000; Ishii *et al.*, 2002; Vermeulen *et al.*, 2002). However, it is clear that CK-mediated cell death necessitates the entry of the hormone into the cell and its subsequent phosphorylation, both in plant and animal cells (Mlejnek and Procházka, 2002; Mlejnek *et al.*, 2003). Furthermore, a correlation between high level of CKs and accumulation of stress genes, including pathogenesis-related (PR) genes, has been reported both in whole plant tissues (Memelink *et al.*, 1990; Martineau *et al.*, 1994; Rakwal *et al.*, 2003) or *in vitro* tissue cultures (Memelink *et al.*, 1987; Poupet *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 2004), suggesting the induction of a stress response by CKs.

In a previous study, we showed that tobacco cell lines underexpressing NtBI-1 die prematurely when subjected to sucrose starvation (Bolduc and Brisson, 2002), a situation that favors the activation of senescence, and thus suggest a role for BI-1 in the control of this process. Interestingly, while investigating for PCD-related hormones that could modulate BI-1, tobacco cells provided with exogenous 6-benzylaminopurine (Bap), a synthetic active CK, revealed up-regulation of NtBI-1 at the protein level. Here we show that CKs induce a stress response concomitant with NtBI-1 over-accumulation in cultured tobacco cells, which depends on post-transcriptional events but not on Ca<sup>2+</sup> signaling.

## 4.2.4 Materials and Methods

### 4.2.4.1 Plant material, culture conditions and hormonal treatments

Unless otherwise specified, chemicals were obtained from Sigma. *N. tabacum* cv. Xanthi and cv. Wisconsin-38 (the later expressing apoaequorin; see Cessna and Low, 2001) suspension cells were subcultured weekly in MS medium supplemented with 3% sucrose and 4.5  $\mu$ M 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). For treatments, four-day-old cells were diluted 1:1 with fresh medium and used two days later, thus obtaining a homogenous exponentially growing cell population equivalent to 3-4 days post transfer (DPT) cells, while the time “96 h” was equivalent to 7-8 DPT. When specified, CKs [Bap, N<sup>6</sup>-(2-isopentenyl)adenosine (iPA), kinetin (Kin) or zeatin (Zea)] were added to the medium from a 5 mM stock solution, prepared by first dissolving the powder in a drop of 0.1 N HCl (final 2 mM). Control cells were treated with the CK structural analog adenine (10  $\mu$ M) or an appropriate volume of 2 mM HCl.

### 4.2.4.2 Adenosine kinase inhibitor assay, short treatment assay and others

Treatments of cells with adenosine kinase inhibitor (AdkI) were performed using 5'-amino-5'-deoxyadenosine p-toluenesulfonate salt. Stock solution (0.1 M) was made in dimethyl sulfoxide (DMSO) and added to cells 5-10 minutes prior addition of Bap or 2 mM HCl. DMSO was added to control cells in accordance to its concentration in treated cells (maximum 0.8%). Short treatment assays were performed as described by Carimi *et al.* (2003) with some modifications. After the specified incubation period, Bap and/or other chemicals were removed from the medium by washing cells three times in MS salts, and cells were then transferred into “medium without Bap” (conditioned medium without Bap from same-age cultured cells). All cells pre-treatments with LaCl<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub>, A23187 or 1,2-Bis(2-aminophenoxy) ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (Bapta) were done for a period of five minutes.

#### **4.2.4.3 Immunoblot and northern blot analysis**

Preparation of protein extracts and immunoblot analysis using anti-BI-1 antibodies raised against the C-terminal extremity of AtBI-1 have been described elsewhere (Bolduc and Brisson, 2002). Lysis buffer was added to ground material at a ratio of 150  $\mu\text{l}$  per 100 mg, resulting in homogenous protein content in all samples (around 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Gel electrophoresis was performed using 30  $\mu\text{l}$  of these extracts (60  $\mu\text{g}$  of total protein) and homogenous loading was assessed by Ponceau red staining of membranes. All procedures for northern blot were done according to Bolduc *et al.* (2003).

#### **4.2.4.4 Fresh weight increase and cell viability determination**

After 96 h of treatment, cells were collected on filter papers under vacuum, weighted immediately and values were adjusted to 1 ml of culture. Value from day 0 was subtracted in order to get the gain of fresh weight per ml of culture. For determination of viability, cells were collected in microcentrifuge tubes (0.5 ml packed cell volume), and incubated for 5 minutes in the dark with 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  fluorescein diacetate (FDA), which specifically stains living cells. Cells were then washed once in MS medium and resuspended in MS to a final volume of 1 ml. Intensity of cellular fluorescence was measured in a 96-wells plate with a Fluoroskan Ascent FL (ThermoLabsystems, Finland) using an excitation wavelength of 488 nm and an emission bandpass filter of 527 nm. Viability in control cells remained over 95% under our experimental conditions, thus values from treated cells were expressed as percentage of control cells value. In preliminary experiments, validation of the method was performed by microscopic counts using FDA or the exclusion stain Evan's blue.

#### **4.2.4.5 Luminometry and $\text{Ca}^{2+}$ quantification**

Luminometry of aequorin-transformed suspension cultures was performed as previously described (Cessna and Low, 2001), with some minor changes. Briefly, 48 h after subculture into fresh MS medium, 1  $\mu\text{M}$  coelenterazine (Nanolight Technology, Pinetop, AZ) was added to cells for 14-20 h. An aliquot (0.1 ml) was then transferred to a luminometer

cuvette and placed in a Turner Designs TD 20/20 luminometer chamber. Luminescence was integrated 5 times per second. CKs were added from 50  $\mu\text{M}$  stock solutions, which were corrected to the osmolarity of the MS media (measured at 180  $\pm$  4 mOsM with a vapor pressure osmometer) by the addition of 180 mM sucrose. No measurable change in osmolarity or pH occurred in cell culture media after addition of either CK in sucrose, or the addition of a 180 mM sucrose solution used as control.  $\text{LaCl}_3$  and EGTA were added to the cell cultures from 50 mM stock solutions. At the end of each experiment, aequorin was discharged with a detergent solution and  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  was calculated from the resulting luminescence data as previously described (Cessna and Low, 2001).

#### **4.2.4.6 Data analysis**

Data presenting cell death and fresh weight increases are the mean values derived from at least 3 independent experiments performed on different weeks, while immunoblots are typical examples except when specified. All standard deviations and p-values were calculated using the Student's t-test. In the case of  $\text{Ca}^{2+}$  quantification, these values were determined for every point on the graph; the error bars for standard deviations are shown only at select time points.

### **4.2.5 Results**

#### **4.2.5.1 Hormonal modulation of NtBI-1 in cell cultures**

To investigate whether plant BI-1 expression could be under hormonal regulation, we studied the effect on tobacco suspension cells of exogenous application of phytohormones (and  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) known for their positive or negative effect on PCD. Time-course analysis of NtBI-1 accumulation was performed by immunoblots. As summarized in Table 4-1, most phytohormones had no effect on NtBI-1 accumulation at physiological concentrations, or led to a down-regulation that was concomitant with massive cell death, and thus presumably with general proteolysis. The only case where we observed drastic down regulation with limited cell death was when cells were incubated with the ethylene

precursor ACC. On the other hand, SA sometimes led to a slight and transient increased NtBI-1 accumulation when used at a moderately toxic concentration. Of interest, exogenous application of the synthetic CK Bap consistently resulted in an up-regulation of the protein.

**Table 4-1: Effect of various phytohormones and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on NtBI-1 expression and cell fate.**

Compound	[ ] mM	BI-1 modulation <sup>a</sup>	Cell viability <sup>c</sup> (%)	Growth (% of control) <sup>d</sup>
<b>Bap</b>	0.0025	↑	> 95	< 0.1
<b>JA</b>	0.1	no	> 95	100
<b>SA</b>	0.125	no	> 95	> 90
	0.25	↑ (variable) <sup>b</sup>	30-50	~ 40
	0.5	↓	< 5-10	0
<b>ACC</b>	10.0	↓	60-70	0
<b>ABA</b>	0.04	no	> 95	> 90
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	3.0	↓	< 5-10	0

<sup>a</sup> NtBI-1 protein accumulation remained unchanged (no), increased (↑) or diminished (↓) over a period of 96 h as compared to control cells.

<sup>b</sup> Protein accumulation slightly increased in some experiments, while in other it remained relatively stable.

<sup>c</sup> % of cells still viable after 24 h of treatment.

<sup>d</sup> Growth is the fresh weight increase after 96 h of treatment referred as the percentage of control's growth.

#### 4.2.5.2 CKs induce NtBI-1 upregulation at growth limiting concentrations

To better characterize CK-induced NtBI-1 up-regulation, cultures were supplemented with increasing concentrations of four different CKs (Bap, Kin, iPA and Zea), and samples were collected after 24 h for protein analysis. Concomitantly, cell death and fresh weight increases were determined after a 96 h exposure (Tables 4-2 and 4-3). Table 4-2 summarizes the effects on cell viability of physiological to toxic CKs concentrations on *N. tabacum* cvs. Xanthi and Wisconsin-38. The later cells, tested only with Bap application, were slightly more susceptible to this CK than Xanthi cells, as indicated by a lower viability at 10 μM. The precise concentration inducing a significant cell viability reduction in Xanthi cells varied from one CK to another, although all fell in the same concentration

range. Bap and Kin induced cell death at 10  $\mu$ M, while iPA and Zea were only effective at 25  $\mu$ M (Table 4-2). Evaluation of genomic DNA integrity in Bap-treated cells revealed the occurrence of DNA laddering only for 25 and 50  $\mu$ M (data not shown), a characteristic of PCD also observed in others CKs-induced PCD studies. Of note, cells were less likely killed by Zea than by other CKs. Indeed, cell viability was 57% after being exposed for 96 h to 25  $\mu$ M Zea, while it was usually 20-40% with other CKs. Furthermore, around 30% of the cells were still viable at 100  $\mu$ M, while other CKs left no more than 10-20% of viable cells when exposed to 50  $\mu$ M.

**Table 4-2 : Viability decrease in tobacco cells treated with various CKs.**

$\mu$ M	Viability (%) <sup>a</sup>				
	Xanthi				Wisconsin-38
	Bap	iPA	Kin	Zea	Bap
<b>0</b>	100	100	100	100	100
<b>0.01</b>	113	nd	nd	nd	92
<b>0.1</b>	87	115	99	89	97
<b>1</b>	85	106	102	86	102
<b>10</b>	67**	100	74**	95	37*
<b>25</b>	21**	33*	42**	57*	16**
<b>50</b>	10**	18*	20**	30**	12**
<b>100</b>	nd	nd	11**	29**	nd

<sup>a</sup> Viability was determined 96 h after the beginning of the treatment (\* =  $p > 0.05$ ; \*\* =  $p > 0.001$ ; nd = not determined).

Of interest, observations of CK-treated cultures revealed unexpected negative effects on growth at non-lethal CKs concentrations, which were quantified by fresh weight measurements (Table 4-3). Similar to their effect on cell viability, growth reduction in Xanthi cells depended on the nature of the CK. Indeed, as little as 0.1  $\mu$ M Bap was sufficient to reduce growth, while 5  $\mu$ M of iPA, and 0.5  $\mu$ M of Kin and Zea were required to achieve the same effect. Moreover, Bap-induced growth reduction in Xanthi cells required a lower concentration (0.1  $\mu$ M) than in Wisconsin-38 cells (0.5  $\mu$ M). Of note, cells treated with up to 10  $\mu$ M Bap eventually recovered and grew to a cell density comparable to those obtained with control cells, but with an increased period of growth reaching 15 days (data not shown).

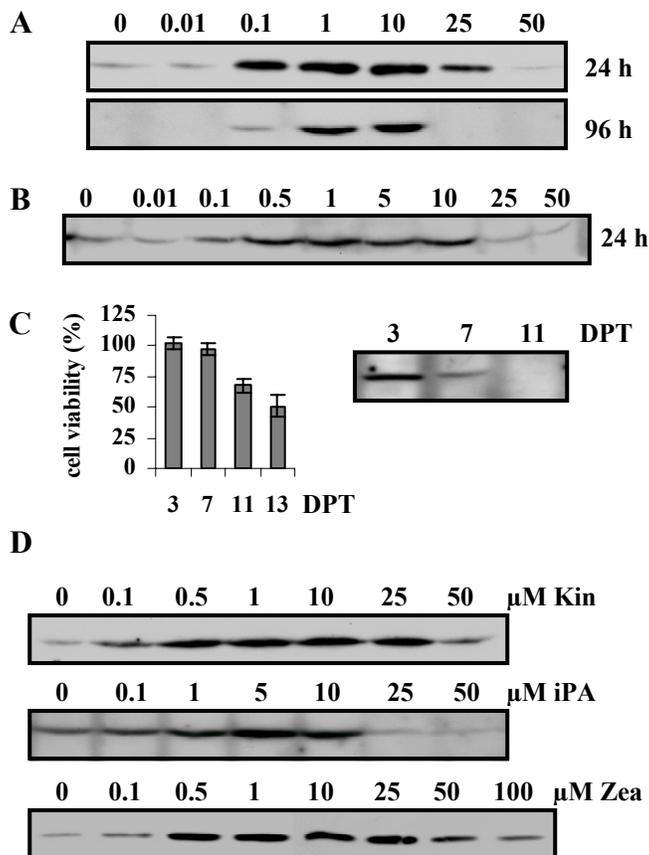
**Table 4-3 : Growth reduction of tobacco cells treated with various CKs.**

$\mu\text{M}$	Fresh weight increase (mg/ml) <sup>a</sup>				
	Xanthi				Wisconsin-38
	Bap	iPA	Kin	Zea	Bap
<b>0</b>	253	233	263	287	176
<b>0.01</b>	267	nd	nd	nd	170
<b>0.1</b>	85**	244	229	283	111
<b>0.5</b>	nd	nd	49*	117*	67*
<b>1</b>	7**	186	15**	93**	48*
<b>5</b>	nd	51*	nd	nd	36*
<b>10</b>	6**	19**	4**	9**	13**
<b>25</b>	0**	-9**	-2**	7**	-23**
<b>50</b>	-27**	-4**	-32**	3**	-33**

<sup>a</sup> Fresh weight increase was determined 96 h after the beginning of the treatment (\* =  $p > 0.05$ ; \*\* =  $p > 0.001$ ; nd = not determined).

We then evaluated the influence of the different CKs on NtBI-1 accumulation by immunoblots. Using Bap, up-regulation of the protein was consistently observed for 0.1-10  $\mu\text{M}$ , sometimes at 25  $\mu\text{M}$  and never at 50  $\mu\text{M}$  (Figure 4-1A). Moreover, the increased accumulation was sustained in the time frame analyzed (up to 96 h) for 1-10  $\mu\text{M}$ , and to a lower extent at 0.1  $\mu\text{M}$ , while at the same time the protein was almost undetectable in control cells. Interestingly, the Bap threshold for NtBI-1 up-regulation was identical to the one leading to growth reduction (Table 4-3). Thus, these data strongly suggest a tight correlation between stress-inducing Bap concentrations (as reflected by limited or absence of growth) and NtBI-1 induction. Significantly, the same correlation was observed in other cell lines, i.e. *N. tabacum* cv. Wisconsin-38 expressing a cytosolic aequorin (Tables 4-2 and 4-3 and Figure 4-1B) and in *N. tabacum* cv. SR-1 (data not shown). However, increased NtBI-1 accumulation was not as strong in Wisconsin-38 as it was in Xanthi cells, although steady-state levels were similar (compare Figures 4-1A and B). Intriguingly, the protein was barely detectable in 96 h control cells (Figure 4-1A), which is equivalent to a 7 days-post-transfer (DPT) stage. At 7 DPT, cells were mostly reaching the stationary phase and still exhibited good viability, but by 11 DPT, viability has already dropped below 70% and NtBI-1 was no detectable anymore, even with over saturated conditions of detection (Figure 4-1C and data not shown).

NtBI-1 up-regulation was not specific to Bap but was also observed with all other tested CKs, although the effective concentrations were variables. For iPA, increased accumulations were only obvious from 1-5 to 10  $\mu\text{M}$  (variable at 1  $\mu\text{M}$ ), while 0.5 to 25  $\mu\text{M}$  Kin and 0.5 to 50  $\mu\text{M}$  Zea produced the same results (Figure 4-1D). Interestingly, as previously observed for Bap, increased NtBI-1 accumulation following these CKs treatments tightly correlated with concentrations that significantly induced growth impairment, which started at 5  $\mu\text{M}$  for iPA, and 0.5  $\mu\text{M}$  for Kin and Zea (Table 4-3).



**Figure 4-1** : NtBI-1 protein accumulation is increased by CKs but decreased by aging.

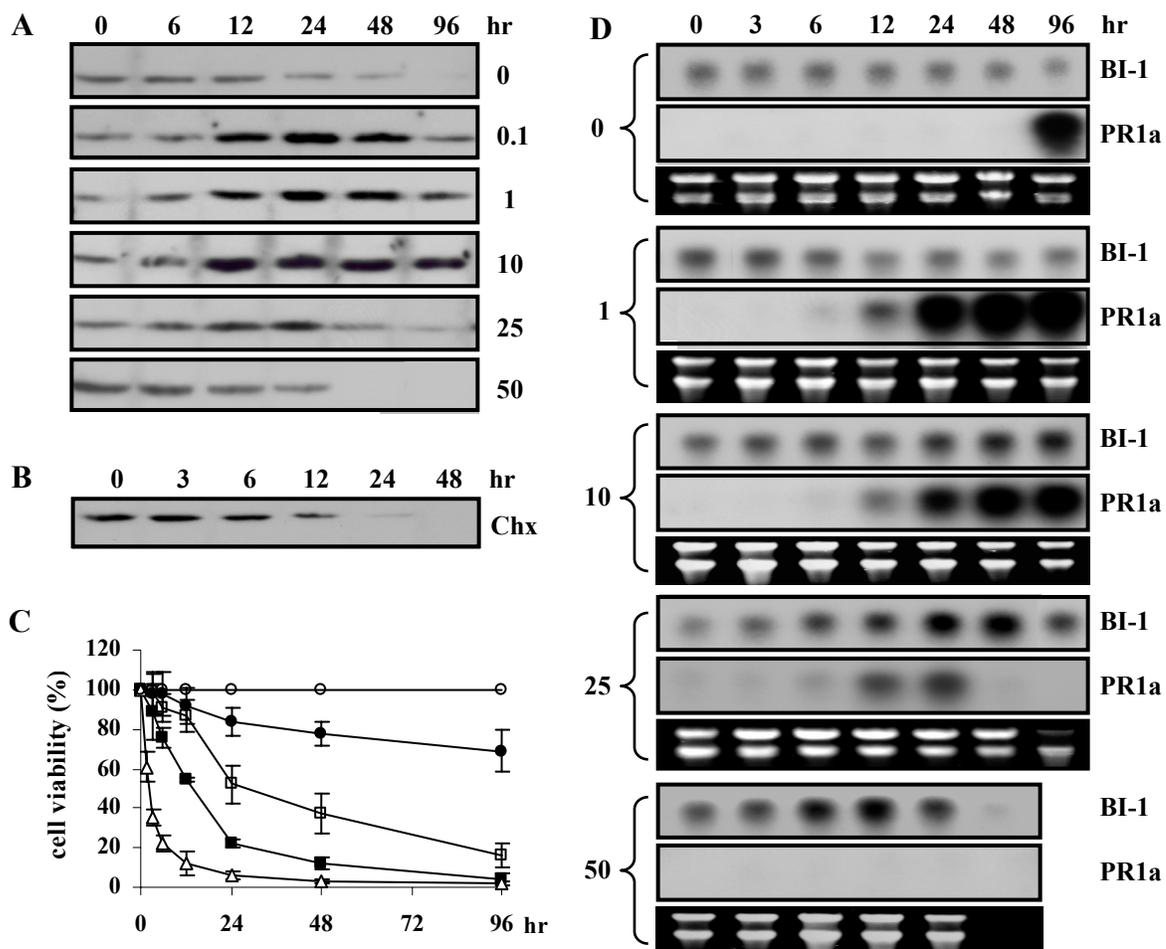
**A-B)** Immunoblots show typical Bap dose-response profiles in cvs. Xanthi (**A**) and Wisconsin-38 (**B**) cells after treatments of 24 or 96 h.

**C)** BI-1 protein expression profile and cell viability in naturally senescing Xanthi cultures. 5 DPT cells were used as control for viability determination.

**D)** Dose-response analysis of NtBI-1 accumulation in Xanthi cells after a 24 h exposure to Kin, iPA or Zea.

#### 4.2.5.3 Bap-induced modulation of NtBI-1 protein accumulation involves post-transcriptional regulation

A time-course analysis on 0.1-50  $\mu\text{M}$  Bap-treated cells was performed to study the effect of CKs on NtBI-1 expression at the protein and mRNA level (Figure 4-2A, D), in relation to cell viability for toxic Bap concentrations (10-50  $\mu\text{M}$ ; Figure 4-2C). Immunoblots revealed that BI-1 over-accumulated 12 h after Bap addition (Figure 4-2A). At 25  $\mu\text{M}$ , the increased accumulation was not always observed and was weaker than in 0.1-10  $\mu\text{M}$  Bap-treated cells (Figures 4-1A, 4-2A and data not shown). At 50  $\mu\text{M}$ , we observed a persistent basal level up to 12 h followed by a slight decrease at 24 h and complete disappearance thereafter (Figure 4-2A). This disappearance correlated with general proteolysis, as determined by the loss of integrity of high molecular weight proteins and Rubisco at 48 h (data not shown). Because most of these cells were already dead by 24 h (Figure 4-2C), we asked how long NtBI-1 could sustain in dying cells. Inhibition of protein synthesis by the use of Chx showed an important decrease in NtBI-1 detection from 12 h (Figure 4-2B), while most of the cells were already dead after 6 h of treatment (Figure 4-2C) and massive proteolysis detected only after 48 h of treatment (data not shown). This indicates a relatively long half-life of the protein (6-12 h, and even more), probably due to its membranous localization. This also indicates that detection of the protein up to 24 h in a situation where cells are obviously dying (i.e. 50  $\mu\text{M}$  Bap) could reflect some up-regulation. Indeed, in 50  $\mu\text{M}$ -treated cells, we observed a relatively strong increase in *NtBI-1* mRNA accumulation that started between 3 and 6 h after Bap addition, followed by an almost complete disappearance after 48 h, concomitantly with massive RNA degradation (Figure 4-2D). A similar but delayed pattern was observed in 25  $\mu\text{M}$ -treated cells (Figure 4-2D). Surprisingly, accumulations were relatively constant over time not only for control, but also for 0.1 (not shown) and 1  $\mu\text{M}$  Bap (Figure 4-2D). Moreover, in 10  $\mu\text{M}$ -treated cells, a slight increased accumulation was only observed after 48 and 96 h (Figure 4-2D). Together with immunoblot analysis, these data clearly indicate that NtBI-1 mRNA accumulation does not necessarily reflect protein accumulation, which can be regulated at the post-transcriptional level (at least in the case described here).



**Figure 4-2** : Bap-induced modulation of NtBI-1 is different at the protein and mRNA level.

**A-B)** Time-course analysis of the NtBI-1 protein in Xanthi cells exposed to 0-50 μM Bap (**A**) or 50 μg/ml Chx (**B**) as determined by immunoblots.

**C)** Time-course analysis of viability in Xanthi cells treated with adenine (○), Bap (10 μM ●; 25 μM □; 50 μM ■) or Chx (Δ).

**D)** Accumulation of NtBI-1 and PR1a mRNAs in Xanthi cells exposed to 1-50 μM Bap as shown by northern blots. Ethidium bromide-stained gels (lower panels) show homogenous RNA loading. Wells with reduced rRNA had degraded RNA visible in the lower part of the gels, reminiscent of massive cell death.

#### **4.2.5.4 Bap-induced stress response can be monitored with the stress marker PR1a**

We also evaluated the accumulation of the defense/stress related marker PR1a at the mRNA level, which is virtually undetectable under standard culture conditions until cells reach the stationary phase (96 h; Figure 4-2D). On the other hand, PR1a mRNA accumulated in the presence 0.1-10  $\mu\text{M}$  Bap (Figure 4-2D and data not shown). Detectable accumulation started between 6 and 12 h and reached a climax after a treatment of 48 h. These accumulation patterns were similar to those observed in cells treated with 125  $\mu\text{M}$  SA (Gilbert, 1999 and data not shown). Interestingly, while 0.1 and 1  $\mu\text{M}$  Bap led to comparable PR1a mRNA accumulations, 10  $\mu\text{M}$  Bap was a less potent inducer (Figure 4-2D), which could be attributable to some cell death (Figure 4-2C). Accordingly, in cells exposed to more toxic concentrations (25-50  $\mu\text{M}$ ), the accumulation was weak and transitory or even undetectable (Figure 4-2D). The PR1a mRNA accumulation pattern was thus opposite to the one observed for NtBI-1 at the mRNA level but correlated with NtBI-1 accumulation at the protein level. Of note, NtBI-1 mRNA increased accumulation was far less impressive than the one observed for PR1a.

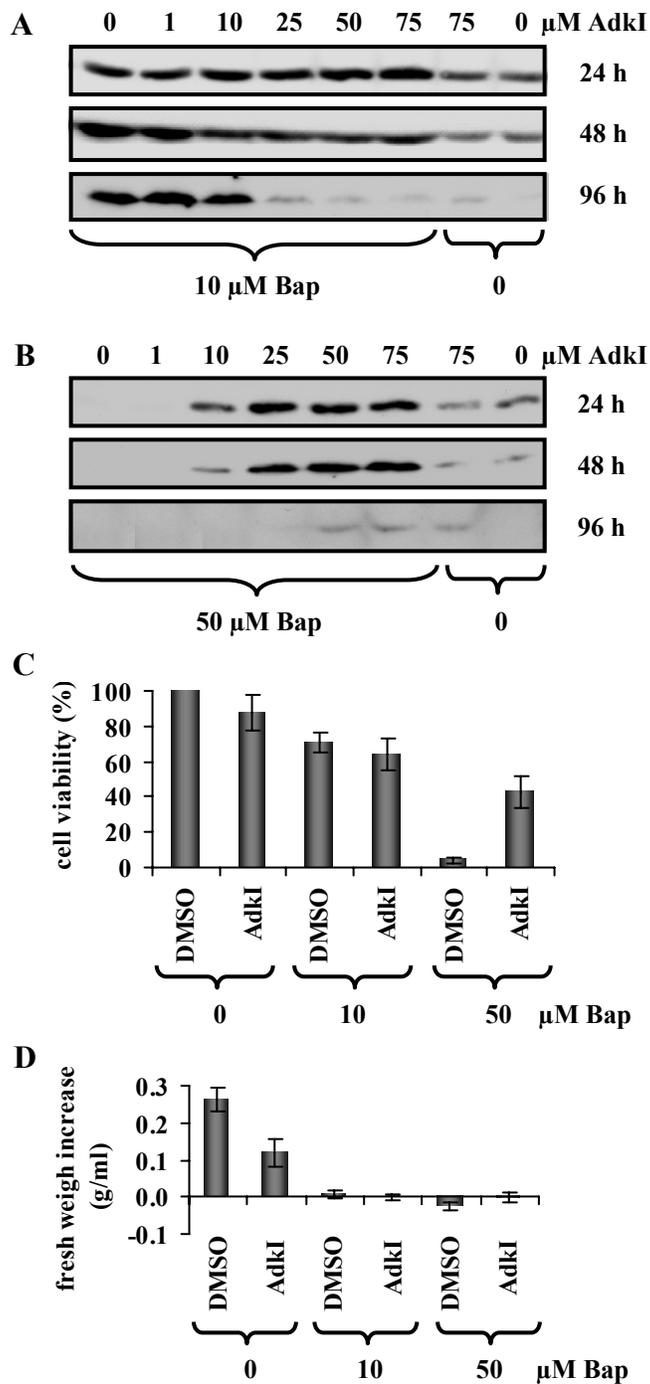
#### **4.2.5.5 Inhibition of intracellular Bap phosphorylation modifies Bap-induced NtBI-1 up-regulation**

Intracellular CK phosphorylation has been previously found to be important for their cytotoxic activity (Mlejnek and Kuglik, 2000; Ishii *et al.*, 2002; Mlejnek *et al.*, 2003). To verify whether it is also important for increased NtBI-1 accumulation, we exposed cells to 10 and 50  $\mu\text{M}$  Bap concomitantly with increasing concentrations of 5'-amino-5'-deoxyadenosine, a potent adenosine kinase inhibitor (AdkI) functional in tobacco cells (Mlejnek *et al.*, 2003). NtBI-1 expression profiles for 10  $\mu\text{M}$  Bap (Figure 4-3A) showed a transient rather than a sustained overexpression of the protein, in a [AdkI]-dependent manner, without apparent effect on cell viability (Figure 4-3C) and growth (Figure 4-3D). On the other hand, the pre-treatment with AdkI led to NtBI-1 protein upregulation at the highly toxic 50  $\mu\text{M}$  Bap (in a [AdkI]-dependent manner; Figure 4-3B), concomitantly with partial restoration of viability (Figure 4-3C) but not growth (Figure 4-3D). These data

indicate that CK phosphorylation status affect NtBI-1 protein accumulation, potentially by affecting the stress response. Moreover, it suggests that CK-mediated NtBI-1 protein over-accumulation may depend on length of exposure to CKs, rather than on receptor binding and phosphorelay signal transduction.

#### **4.2.5.6 Bap-induced NtBI-1 up-regulation requires a minimal exposure time**

To address whether Bap-induced NtBI-1 up-regulation is time-dependent, cells were incubated for 1 h with 0 to 50  $\mu\text{M}$  Bap, washed and then further incubated under standard conditions for 23 h. Under this short exposure, only high Bap concentrations (i.e. 10-50  $\mu\text{M}$ ) were sufficient to stimulate NtBI-1 up-regulation but also to fully impair growth (Figure 4-4A and D). Lower concentrations had no (0.1  $\mu\text{M}$  Bap) or limited (1  $\mu\text{M}$  Bap) effect on NtBI-1 accumulation, while their influence on growth was very limited or moderate, respectively (Figure 4-4A and D). Moreover, while longer exposure to 50  $\mu\text{M}$  Bap was lethal, the washing procedure reducing the exposure time to 1 h restored viability (Figure 4-4C). This probably explains why NtBI-1 up-regulation can be observed in these conditions. Interestingly, the tight correlation between growth impairment and NtBI-1 induction is again observed. Of note, an exposure as short as 5 minutes to 10 and 50  $\mu\text{M}$  Bap was enough to induce NtBI-1 up-regulation (Figure 4-4B and data not shown).

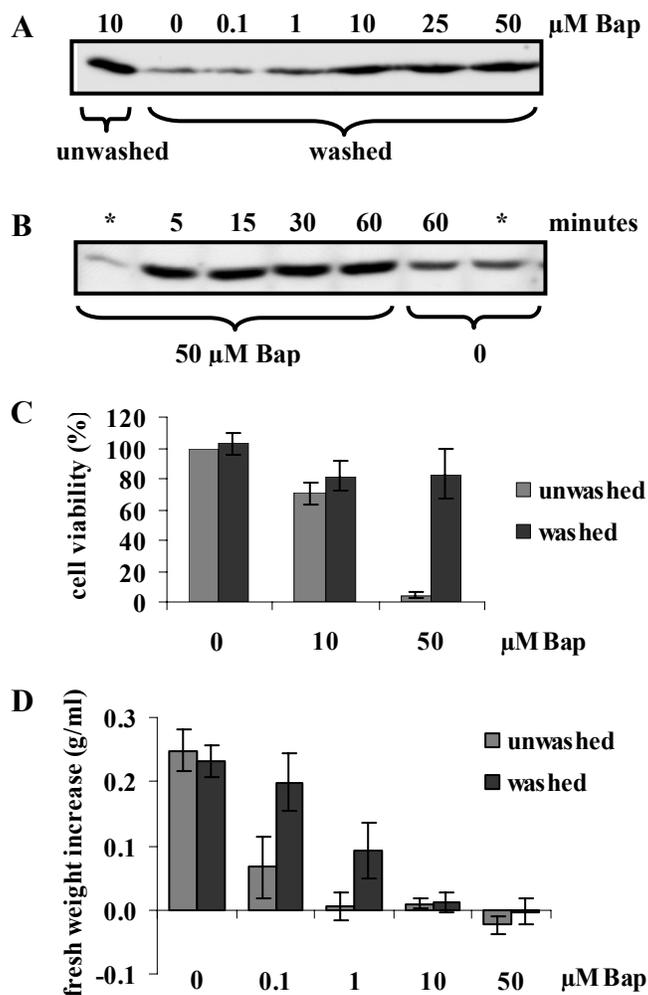


**Figure 4-3** : Inhibition of intracellular Bap phosphorylation affects NtBI-1 accumulation.

Cells were pre-treated with different concentrations of AdkI and then exposed to Bap for 24, 48 or 96 h. Accumulation of the NtBI-1 protein was analyzed by immunoblots.

**A-B)** Analysis of NtBI-1 accumulation at 10 and 50  $\mu\text{M}$  Bap.

**C-D)** Effects on cell viability and growth were evaluated 96 h after treatment.



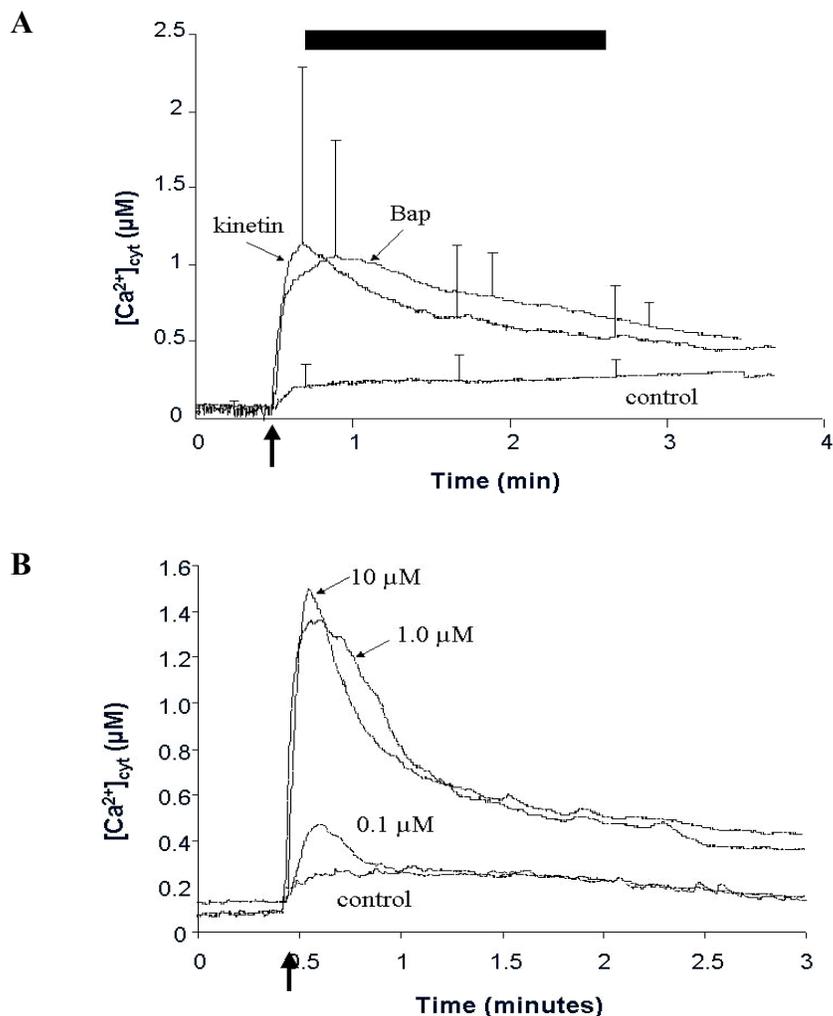
**Figure 4-4** : Short Bap treatments demonstrate the importance of a minimal exposure time for the observation of NtBI-1 over-accumulation and growth impairment.

**A-B**) Cells were treated for 60 minutes with different concentrations of Bap (**A**) or for 5-60 minutes with 50 μM Bap (**B**) and collected 24 h later for immunoblot analysis of the NtBI-1 protein accumulation.

**C-D**) Effects of short treatments on cell viability and growth were evaluated 96 h after treatment.

#### 4.2.5.7 NtBI-1 protein accumulation is not sensitive to modulations of $\text{Ca}^{2+}$ homeostasis

Because of its localization to ER membranes, a  $\text{Ca}^{2+}$  reservoir, BI-1 is suspected to exert its function through some influence on  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis. CK-induced  $\text{Ca}^{2+}$  uptake in cells of the bryophyte mosses *Funaria hygrometrica* and *Physcomitrella patens* has already been reported (Saunders and Hepler, 1983; Hahm and Saunders, 1991; Schumaker and Gizinski, 1993), and we asked if Bap-induced NtBI-1 up-regulation could be the consequence of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  signaling. For this purpose, we first measured CK-induced  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$  pulses in aequorin-transformed suspension cells (Figure 4-5). Both Bap and Kin (Figure 4-5A), but not Zea (data not shown), induced rapid and substantial  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$  pulses, each reaching a climax of greater than 1  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  within the first minute of cytokinin application, followed by a slow sustained decrease to  $\frac{1}{2}$  maximal levels after three minutes. Intriguingly, extensive variability in pulse amplitude was observed from day to day (note the size of the error bars in Figure 4-5A, and compare average amplitudes in Figure 4-5A to the representative example in 4-5B). However, in several different experiments, we could determine that maximal pulse amplitude was reached with  $\sim 1 \mu\text{M}$  Bap and the minimal concentration required to initiate a  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$  pulse was  $\sim 0.1 \mu\text{M}$  (Figure 4-5B). Interestingly, this range coincided with the minimal concentration range necessary to induce NtBI-1 up-regulation as well as significant growth reduction ( $0.5 \mu\text{M}$ ; Figure 4-1B and Table 4-3).



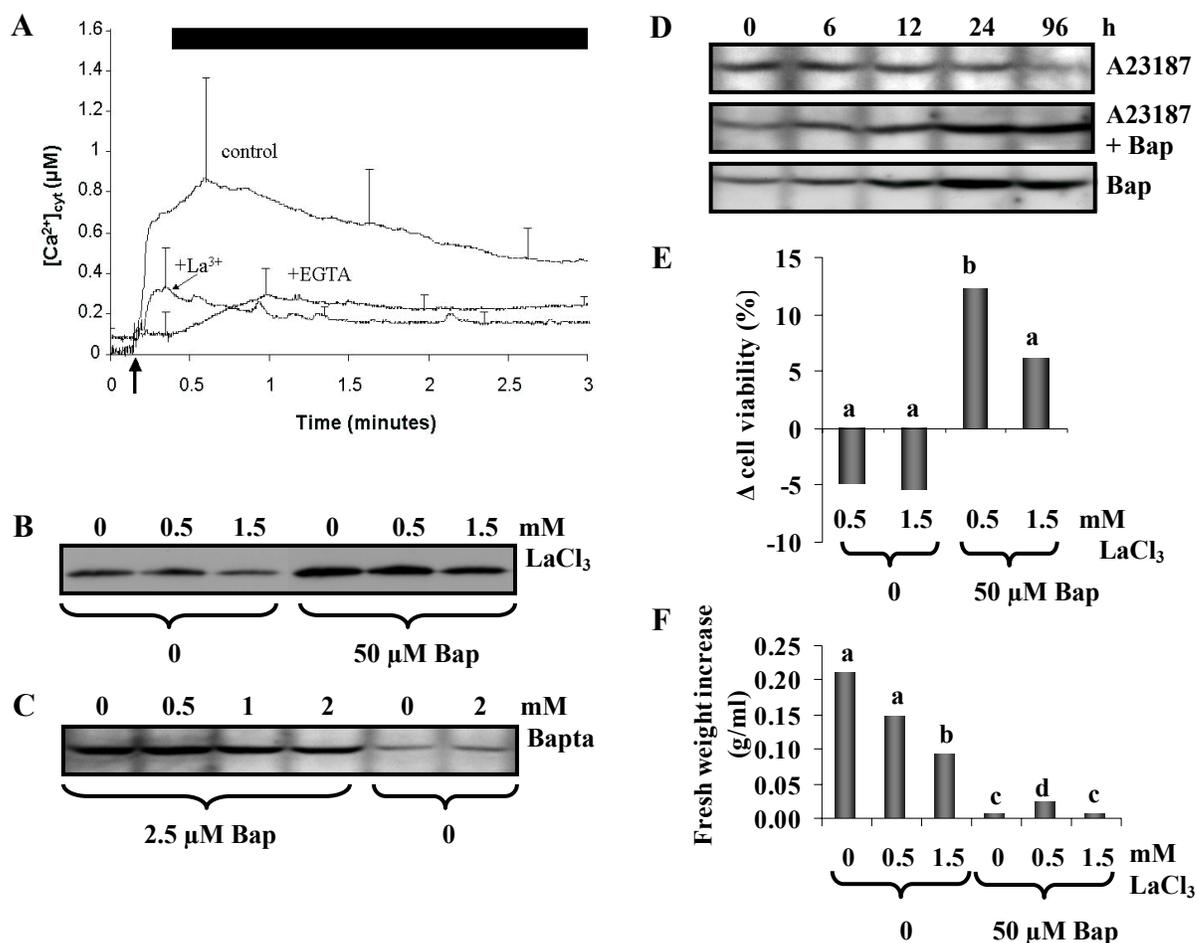
**Figure 4-5 : Bap and Kin induce a rapid and transient cytosolic  $Ca^{2+}$  flux.**

Aequorin-transformed and reconstituted *N. tabacum* cv. Wisconsin-38 cells were treated with CKs or with vehicle control solution at the time indicated by the bold arrow.

**A)** Cells were treated with 25  $\mu M$  Bap or Kin. Each trace is the average of 8 or more independent identical experiments. The region of the graph under the black bar is that during which the  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  values for both Bap- and Kin-treated cells differ statistically ( $p < 0.01$ ) from the control trace. There is no significant difference between the responses generated by Bap and Kin ( $p > 0.05$ ).

**B)** Dose-response analysis using 0.1-10  $\mu M$  Bap. Data shown are representative of ten independent experiments.

We investigated the role of this  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$  pulse in Bap-mediated PCD as well as in NtBI-1 up-regulation (Figure 4-6). We first noticed the potent inhibition of the CK-induced  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$  pulse by prior addition of the cation channel blocker  $\text{LaCl}_3$ , or the cell-impermeant  $\text{Ca}^{2+}$  chelator EGTA (Figure 4-6A), revealing an apoplastic origin of the  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$  pulse. However, such an inhibition using up to 1.5 mM  $\text{LaCl}_3$  or the cell-impermeant  $\text{Ca}^{2+}$  chelator Bapta did not affect Bap-induced NtBI-1 up-regulation (Figure 4-6B, C). Similar observations were made using up to 1.5 mM  $\text{GdCl}_3$  or 5 mM EGTA (data not shown). On the other hand, direct modulation of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration by the use of the  $\text{Ca}^{2+}$  ionophore A23187 did not influence NtBI-1 expression pattern in control or Bap-treated cells (Figure 4-6D). Similarly, neither  $\text{CaCl}_2$  nor A23187 had an influence on NtBI-1 accumulation pattern when added independently (data not shown). Interestingly, 0.5 mM  $\text{LaCl}_3$  partially but significantly restored cell viability (Figure 4-6E).  $\text{LaCl}_3$  had also a positive effect on growth, which was significant although limited, probably due to its toxicity (Figure 4-6F). Moreover, we also induced cell death with chemicals known to cause depletion of plant intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores, such as caffeine (Cessna *et al.*, 1998), mastoparan (Franklin-Tong *et al.*, 1996; Tucker and Boss, 1996; Takahashi *et al.*, 1998) or cyclopiazonic acid (Zuppini *et al.*, 2004). When these compounds were used at sub-lethal concentrations, the NtBI-1 protein accumulation remained unchanged, while toxic concentrations led to its down-regulation concomitant with massive cell death (data not shown), similar to the pattern observed for 50  $\mu\text{M}$  Bap. These data indicate that an influx of externally-derived  $\text{Ca}^{2+}$  into the cytosol is an early event in CK-induced PCD. Moreover, it reveals that NtBI-1 accumulation is not sensitive to alterations of the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis, and its up-regulation by CKs is not mediated by a  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive pathway.



**Figure 4-6 : Inhibition of Bap-induced  $\text{Ca}^{2+}$  fluxes do not interfere with NtBI-1 over-accumulation but partially restores cell viability.**

**A)** Wisconsin-38 cells were treated with 1.5 mM  $\text{LaCl}_3$ , 5 mM EGTA or untreated (control), then immediately placed in the luminometer chamber and stimulated with 12.5  $\mu\text{M}$  Bap (bold arrow). Each trace is an average of 4 or more independent experiments. The region of the graph under the black bar is that over which the  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  values for both EGTA- and  $\text{La}^{3+}$ -treated cells differ statistically ( $p < 0.05$ ) from control cells.

**B-C)** Xanthi cells were treated with the indicated amount of  $\text{LaCl}_3$  or Bapta, and then exposed to 50 (**B**) or 2.5 (**C**)  $\mu\text{M}$  Bap. Cells were collected 24 h later for immunoblots analysis of NtBI-1. In (**B**), Bap exposure was of 5 min as described in Figure 4.

**D)** Effect of  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  modulation on Bap-induced up-regulation of the NtBI-1 protein. Xanthi cells were pretreated with 5 mM  $\text{CaCl}_2$  in the presence or absence of 5  $\mu\text{M}$  A23187, and then stimulated with 2.5  $\mu\text{M}$  Bap. NtBI-1 was analyzed by immunoblots.

**E-F)** Cell viability and growth evaluated 96 h after co-treatment of Xanthi cells with  $\text{LaCl}_3$  and Bap (as in **B**). Significant differences are represented by different letters ( $p < 0.05$ ; assessed from 5 independent experiments). In (**E**),  $\Delta$  cell viability was estimated by subtracting from the value of  $\text{LaCl}_3$ -treated cells the value of their respective control (0 mM  $\text{LaCl}_3$ ).

## 4.2.6 Discussion

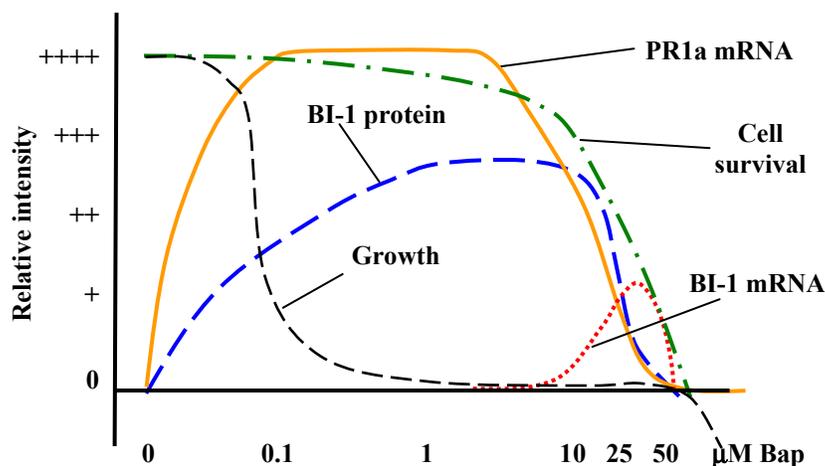
### 4.2.6.1 Induction of a stress response by CKs in tobacco cells involves NtBI-1

In this study, we bring evidences that tobacco suspension cells present symptoms of a stress response involving increased NtBI-1 accumulation when provided with exogenous CKs at physiological levels. The minimal CKs concentrations required to significantly impair growth (from 0.1 to 5  $\mu$ M) coincide with those promoting the NtBI-1 protein up-regulation, which are also concomitant with the PR1a mRNA induction under Bap treatments. The later mRNA encodes the most abundant PR protein in tobacco, typically associated with biotic stresses, further supporting the view of a stress response. In this context, increasing the NtBI-1 protein accumulation might help cells to survive to the insult and so be part of this stress response. This is also demonstrated by the use of any means that lowers Bap-induced stress and toxicity, such as AdkI and short treatments. In all these experiments, up-regulation occurs only for those situations promoting a stress response, revealed by a significant growth reduction. The relative effects of increasing amounts of Bap on different parameters assessed in this study are resumed in Figure 4-7. It clearly illustrates the tight relation between the NtBI-1 protein up-regulation, PR1a mRNA induction, growth impairment and cell survival. Of note, accumulation of PR1a mRNA and NtBI-1 protein were severely reduced when Bap concentration reached a toxic level, suggesting the activation at that point of a PCD pathway rather than a stress/defense pathway.

### 4.2.6.2 Bap influences post-transcriptional regulation of NtBI-1

Intriguingly, we noted many discrepancies between NtBI-1 protein and mRNA levels in the course of this study. First, NtBI-1 disappears from protein extracts of naturally (Figure 4-1C) or sucrose starvation-induced (cvs. Xanthi and BY-2; N. Bolduc and L. Brisson, unpublished data) senescing cultures, or when cells are treated with the ethylene precursor ACC (Table 4-1). On the other hand, NtBI-1 mRNA accumulation remains relatively stable from 3 to 7 DPT, and its counterpart in cultured *Arabidopsis* cells exhibits a relative constant level in aging cells (Swidzinski *et al.*, 2002). In all cases, the phenomenon can not

be explained by general proteolysis that accompanies cell death since NtBI-1 disappearance preceded death (Figure 4-1C and unpublished data). As an anti-PCD protein, disappearance of NtBI-1 could mark the transition between a surviving mode to the execution of a PCD program. These results prompt us to speculate that cells systematically maintain a basal NtBI-1 mRNA expression level, but adjust the production of the corresponding protein as needed.



**Figure 4-7** : Schematic representation of the relative effects of 0-50  $\mu\text{M}$  Bap on growth, cell survival, accumulation of the NtBI-1 protein as well as accumulation of PR1a and NtBI-1 mRNAs in tobacco Xanthi cells.

Data integrated from different periods of treatment are presented (24 h : PR1a and NtBI-1 mRNA, NtBI-1 protein, cell survival; 96 h: growth).

This hypothesis is further supported by the fact that low-moderate Bap concentrations lead to up-regulation of the NtBI-1 protein, while the accumulation of the mRNA remains relatively constant. The increased accumulation of the protein is thus regulated at the post-transcriptional level, consistent with some known effects of CKs including stimulation of protein synthesis (Fosket and Tepfer, 1978; Tepfer and Fosket, 1978). Of note, the CK-stimulated increased rate of synthesis of three ATP synthase subunits without changes of their corresponding mRNAs levels (in *Lupinus luteus*) is due to specific polyribosome loading (Sherameti *et al.*, 2004).

Finally, we could hardly detect an up-regulation of the NtBI-1 protein under toxic Bap concentrations, while the mRNA steady-state level increased substantially (Figures 4-2 and 4-7). One could speculate that under mild stresses, protein synthesis relies on available NtBI-1 mRNA, which becomes insufficient for substantial protein production under strong stresses. Furthermore, turnover of the protein in dying cells may compensate for overaccumulation in still living cells, resulting in no apparent increased protein accumulation. Of interest, we observed similar accumulation profiles *in planta* in tobacco leaves undergoing massive HR following a permissive tobacco mosaic virus (TMV) infection (N. Bolduc and L. Brisson, unpublished data). Although HR was accompanied by increased NtBI-1 mRNA accumulation, extensive necrosis (and thus proteolysis) occurred within a few hours, so that accumulation of the protein remained constant and finally shut down along with massive necrosis. Similarly, Kawai-Yamada and others (2004) reported BI-1 mRNA induction following exposure to toxic levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and SA in plant cell cultures, but we could hardly obtain correlative data at the protein level (Table 4-1). Even at sub-lethal levels, these compounds were not effective to stimulate up-regulation of the protein (Table 4-1 - 125 μM), while they were effective to induce PR1a mRNA accumulation (in the case of SA; Gilbert, 1999; Norman *et al.*, 2004; our unpublished results). Therefore, our data clearly indicate that BI-1 mRNA accumulation does not always reflect the actual protein accumulation, and inversely protein accumulation does not always reflect mRNA accumulation. The relatively long half-life of the protein should also be taken into account while analyzing protein expression data.

#### 4.2.6.3 Signalization leading to induction of stress and cell death

Molecular mechanisms underlying CK-mediated stress response and PCD remain obscure. Intracellular CKs phosphorylation is required for their cytotoxic activity (Mlejnek and Kuglik, 2000; Ishii *et al.*, 2002; Mlejnek and Procházka, 2002; Mlejnek *et al.*, 2003; this study). Intracellular CK interconversion between the free base and the corresponding nucleoside and nucleotide forms are common (Jameson, 1994; Mok and Mok, 2001) and CK nucleotides are apparently the prominent metabolites formed immediately following cellular uptake (reviewed by Jameson, 1994). Accordingly, the nucleotide benzyladenosine monophosphate (Bad-MP) was the main metabolite (91%) detected 12 h after treatment

with 30  $\mu\text{M}$  Bad in tobacco cells (Mlejnek *et al.*, 2003). Since cells are not permeable to CK-nucleotides (Kamínek *et al.*, 1997), the phosphorylation step could be a means to trap the molecule, but at the same time transforms it into a toxic byproduct. Indeed, Bad-MP accumulated up to 48 h into tobacco cells without apparent inactivation by conversion to another metabolite (Mlejnek *et al.*, 2003), which could be explained by the apparent inability of CK oxidase/deshydrogenase (CKX) to inactivate CK nucleotides (Laloue and Fox, 1989).

Intriguingly, the potent toxicity of the different CKs is unrelated to their known metabolic activity as growth promoter, Zea being usually the most potent (Skoog, 1973). On the contrary, Bap is the most effective stress and cell death inducer, followed by Kin, Zea, and finally iPA (although Zea ranks as the worst when considering only cell death induction). This is probably mostly due to their differential ability to serve as substrates for CKXs (before their eventual conversion to a nucleotide form), whose activities are dependent on the structure of the N<sup>6</sup>-side chain, with an apparent preference for isoprenoid moieties such as those exhibited by iPA and Zea (reviewed by Armstrong, 1994). Bap and Kin, with their phenolic side chain, are hence poor substrates for CKXs. Moreover, CKX more readily cleaves the side chain of iP than the hydroxylated side chain of Zea (reviewed by Armstrong, 1994), which could explain why iPA was a less potent inducer of the stress response. However, this does not provide a satisfactory explanation for the inefficiency of Zea as a cell death inducer. Similarly, Kin and Zea are not efficient cell death inducers in carrot cells (Carimi *et al.*, 2004). Intriguingly, Zea was inefficient to induce a  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$  pulse compared to Kin and Bap. Since our data indicate the partial involvement of the CK-mediated  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$  pulse in PCD induction, the inability of Zea to promote such an effect could be connected to its lower cell death-inducing activity.

$\text{Ca}^{2+}$  is an almost universal intracellular messenger and it has also been recognized as a ubiquitous signal in plant PCD and stress related situations (reviewed by Hoerberichts and Woltering, 2003; White and Broadley, 2003). CK action on  $\text{Ca}^{2+}$  penetration into plant cells was clearly shown in the bryophyte mosses *Funaria hygrometrica* and *Physcomitrella patens* (Saunders and Hepler, 1983; Hahm and Saunders, 1991; Schumaker and Gizinski, 1993). However, evidence for this action remains poor and controversial in the case of

higher plant (Mérillion *et al.*, 1991; Gouvêa *et al.*, 1997; Silverman *et al.*, 1998; Romanov *et al.*, 2002). Data presented in this study clearly show the occurrence of a rapid influx of an external  $\text{Ca}^{2+}$  pulse into cells following Bap application and its partial involvement in the establishment of PCD. This  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$  pulse could thus represent a “ $\text{Ca}^{2+}$  switch” (Scrase-Field and Knight, 2003) that participates to the stressed status of the cell. In animal cells, elevated  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$  is sensed and buffered by mitochondrial uptake (Reddy, 2001), but exceeding the buffering capacity leads to PTP opening and release of apoptogenic proteins such as Cyt $c$ , which activates the apoptosome for the induction of the caspase cascade (Carafoli, 2004; Szabadkai and Rizzuto, 2004). Evidence is lacking for the presence of such a signaling pathway in plants, although Cyt $c$  escape and occurrence of a mitochondrial permeability transition have been reported in plant PCD (Balk and Leaver, 2001; Tiwari *et al.*, 2002; Curtis and Wolpert, 2004). CK-induced PCD is accompanied by a rapid decrease of mitochondrial membrane potential in animal cells (Ishii *et al.*, 2002; Vermeulen *et al.*, 2002) as well as ATP depletion and Cyt $c$  release in plant cells (Mlejnek *et al.*, 2003; Carimi *et al.*, 2003), indicative of mitochondrial dysfunctions in both cell types. Consequently, it is possible that the  $\text{Ca}^{2+}$  switch is sensed by plant mitochondria, and/or by an array of  $\text{Ca}^{2+}$ -sensors proteins.

It was surprising to observe substantial variations in pulses amplitudes and cell responsiveness from day to day experiments. We can speculate that the sensitivity of CK-induced  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$  pulse is potentially due to the nature of the channel involved. Shumacker and Gizinski (1993) demonstrated the involvement of voltage-dependent calcium channels (VDCCs) in CK action in moss. Opening of voltage-dependent ions channels, which is only transitory, depends of membrane depolarization, and after closing they remain refractory to further opening until repolarization (Jones, 2003). Mild stresses imposed on cultured cells (such as alteration in the shaking speed or direction) might activate the opening of such channels, making them refractory to further stimulation by CKs. Of interest, ABA-induced  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$  pulse in guard cells involves VDCCs (Yang *et al.*, 2004).

#### 4.2.6.4 NtBI-1 modulation, Ca<sup>2+</sup> signaling and other considerations

ROS signaling has been suggested to be a signal for BI-1 induction (Kawai-Yamada *et al.*, 2004). In this report we investigated whether BI-1 modulation could be mediated by Ca<sup>2+</sup> signaling. It is apparently not the case, although Bap-mediated up-regulation of the NtBI-1 protein coincided with a stress response and an influx of external Ca<sup>2+</sup>. Indeed, any modulations of the Ca<sup>2+</sup> homeostasis (including by Bap treatments) failed to change the accumulation profile of the protein. This indicates that if the cytosolic Ca<sup>2+</sup> level has any influence on NtBI-1 function, this is not *via* the modulation of its accumulation, although modulation of its activity can not be excluded at the moment. Conversely, a number of data point toward the involvement of plant BI-1 in Ca<sup>2+</sup> homeostasis. In metazoans, ER stresses induce the opening of ER Ca<sup>2+</sup> channels and subsequent Ca<sup>2+</sup> uptake by mitochondria, potentially leading to the activation of a death program following mitochondrial dysfunctions (Orrenius *et al.*, 2003). Pro-apoptotic proteins such as Bax and Bak help maintaining a higher [Ca<sup>2+</sup>]<sub>ER</sub> steady-state (Scorrano *et al.*, 2003; Oakes *et al.*, 2005), while the anti-apoptotic Bcl-2 rather favors a lower level (reviewed by Distelhorst and Shore, 2004). This represents more (Bax) or less (Bcl-2) Ca<sup>2+</sup> release from the ER when cells are under adverse conditions integrated at the ER (e.g. accumulation of misfolded proteins), and thus more or less opportunity to reach Ca<sup>2+</sup> overload by mitochondria and subsequent PCD induction. BI-1 can counteract Bax toxicity without direct protein-protein interaction and in different cellular systems (see introduction), thus opening the possibility of a lowering effect of BI-1 on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>ER</sub> steady-state. Indeed, Chae and others (2004) recognized the hypersensitivity of *bi-1*<sup>-/-</sup> mice cells to apoptosis induced by ER stress agents, and found that BI-1 overexpression reduces releasable Ca<sup>2+</sup> from the ER similar to Bcl-2. This definitively links the BI-1 protein to the control of Ca<sup>2+</sup> homeostasis, although how it exerts this action remains unknown. It could involve the modulation of the expression or activity of Ca<sup>2+</sup>-regulating proteins, as observed for Bcl-2 (reviewed by Distelhorst and Shore, 2004; Oakes *et al.*, 2005).

Taken all together, our data indicate that increasing the accumulation of the NtBI-1 protein in the course of the stress response to CKs might contribute to cell survival. BI-1 is part of a pathway where its expression level influence cellular ability to resist to carbon starvation-

or senescence-induced stresses (Bolduc and Brisson, 2002), potentially *via* modulation of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis (Chae *et al.*, 2004). Modulation of BI-1 levels by CKs might be indirectly due to the activation of the stress response, although we can not exclude at the moment a direct effect of CKs *via* the two-component phosphorelay system (Hutchison and Kieber, 2002). Unraveling the signalization leading to this CK-mediated BI-1 up-regulation will need further studies, which could also reveal the involvement of this negative PCD regulator in the senescence delay-activities of CKs.

#### **4.2.7 Acknowledgements**

We thank Frédéric Pitre for preliminary works and Dr Dominick Pallotta for helpful commentaries on the manuscript. This work was supported by grants to LB from the NSERC (National Sciences and Engineering Research Council of Canada).

#### 4.2.8 References

- Ainley, W.M., McNeil, K.J., Hill, J.W., Lingle, W.L., Simpson, R.B., Brenner, M.L., Nagao, R.T., & Key, J.L. (1993) Regulatable endogenous production of cytokinins up to 'toxic' levels in transgenic plants and plant tissues. *Plant Mol Biol* 22: 13-23.
- Aravind, L., Dixit, V.A., & Koonin, E.V. (2001) Apoptotic molecular machinery: vastly increased complexity in vertebrates revealed by genome comparisons. *Science* 291: 1279-1284.
- Armstrong, D.J. 1994. Cytokinin oxidase and the regulation of cytokinin degradation. *In* Cytokinins: chemistry, activity and function. D.W. Mok & M.C. Mok, editors. CRC Press. 139-154.
- Balk, J., & Leaver, C.J. (2001) The PET1-CMS mitochondrial mutation in sunflower is associated with premature programmed cell death and CytC release. *Plant Cell* 13: 1803-1818.
- 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: 111-114.
- 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: 377-386.
- Butler, R.D., & Simon, E.W. (1971) Ultrastructural aspects of senescence in plants. *Adv Gerontol Res* 3: 73-129.
- Carafoli, E. (2004) Calcium-mediated cellular signals: a story of failures. *Trends Biochem Sci* 29: 371-379.
- Carimi, F., Terzi, M., De Michele, R., Zottini, M., & Lo Schiavo, F. (2004) High levels of the cytokinin BAP induce PCD by accelerating senescence. *Plant Sci* 166: 963-969.

- Carimi, F., Zottini, M., Formentin, E., Terzi, M., & Lo Schiavo, F. (2003) Cytokinins: new apoptotic inducers in plants. *Planta* 216: 413-421.
- Cessna, S.G., Chandra, S., & Low, P.S. (1998) Hypo-osmotic shock of tobacco cells stimulates  $\text{Ca}^{2+}$  fluxes deriving first from external and then internal  $\text{Ca}^{2+}$  stores. *J Biol Chem* 273: 27286-27291.
- Cessna, S.G., & Low, P.S. (2001) An apoplastic  $\text{Ca}^{2+}$  sensor regulates internal  $\text{Ca}^{2+}$  release in aequorin-transformed tobacco cells. *J Biol Chem* 276: 10655-10662.
- Chae, H.J., Kim, H.R., Xu, C., Bailly-Maitre, B., Krajewska, M., Krajewski, S., Banares, S., Cui, J., Digicaylioglu, M., Ke, N., Kitada, S., Monosov, E., Thomas, M., Kress, C.L., Babendure, J.R., Tsien, R.Y., Lipton, S.A., & Reed, J.C. (2004) BI-1 regulates an apoptosis pathway linked to endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell* 15: 355-366.
- Curtis, M.J., & Wolpert, T.J. (2004) The victorin-induced mitochondrial permeability transition precedes cell shrinkage and biochemical markers of cell death, and shrinkage occurs without loss of membrane integrity. *Plant J* 38: 244-259.
- Distelhorst, C.W., & Shore, G.C. (2004) Bcl-2 and calcium: controversy beneath the surface. *Oncogene* 23: 2875-2880.
- Fosket, D.E., & Tepfer, D.A. (1978) Hormonal regulation of growth in cultured plant cells. *In Vitro* 14: 63-75.
- Franklin-Tong, V.E., Drobak, B.K., Allan, A.C., Watkins, P., & Trewavas, A.J. (1996) Growth of pollen tubes of *Papaver rhoeas* is regulated by a slow-moving calcium wave propagated by inositol 1,4,5-trisphosphate. *Plant Cell* 8: 1305-1321.
- Gallaher, B.W., Hille, R., Raile, K., & Kiess, W. (2001) Apoptosis: live or die - hard work either way! *Horm Metab Res* 33: 511-519.
- Gilbert, M. 1999. Importance des salicylates et des cytokinines sur les mécanismes de défense chez les suspensions cellulaires de *Nicotiana tabacum*. In Biochimie et Microbiologie. Université Laval, Québec. 99 pp.

- Gouvêa, C.M.C.P., Vidal, B.C., & Martins, I.S. (1997) Measuring cytoplasmic calcium level in *Citrus* protoplasts using the fluorescent probe indo-1. *J Plant Physiol* 151: 329-333.
- Hahm, S.H., & Saunders, M.J. (1991) Cytokinin increases intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in *Funaria*: detection with Indo-1. *Cell Calcium* 12: 675-681.
- Hoeberichts, F.A., & Woltering, E.J. (2003) Multiple mediators of plant programmed cell death: interplay of conserved cell death mechanisms and plant-specific regulators. *Bioessays* 25: 24-57.
- Hückelhoven, R. (2004) BAX Inhibitor-1, an ancient cell death suppressor in animals and plants with prokaryotic relatives. *Apoptosis* 9: 299-307.
- Hückelhoven, R., Dechert, C., & Kogel, K.H. (2003) Overexpression of barley BAX inhibitor 1 induces breakdown of *mlo*-mediated penetration resistance to *Blumeria graminis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 5555-5560.
- Hutchison, C.E., & Kieber, J.J. (2002) Cytokinin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14 Suppl: S47-59.
- Ishii, Y., Hori, Y., Sakai, S., & Honma, Y. (2002) Control of differentiation and apoptosis of human myeloid leukemia cells by cytokinins and cytokinin nucleosides, plant redifferentiation-inducing hormones. *Cell Growth Differ* 13: 19-26.
- Jameson, P.E. 1994. Cytokinin metabolism and compartmentation. *In* Cytokinins: chemistry, activity and function. D.W. Mok & M.C. Mok, editors. CRC Press. 113-128.
- Jones, A.M. (2001) Programmed cell death in development and defense. *Plant Physiol* 125: 94-97.
- Jones, S.W. (2003) Calcium channels: unanswered questions. *J Bioenerg Biomembr* 35: 461-475.

- Kamínek, M., Motyka, V., & Vanková, R. (1997) Regulation of cytokinin content in plant cells. *Physiol Plant* 101: 689-700.
- 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: 143-147.
- 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: 12295-12300.
- Kawai-Yamada, M., Ohori, Y., & Uchimiya, H. (2004) Dissection of *Arabidopsis* Bax inhibitor-1 suppressing Bax-, hydrogen peroxide-, and salicylic acid-induced cell death. *Plant Cell* 16: 21-32.
- Laloue, M., & Fox, J.E. (1989) Cytokinin oxidase from wheat: partial purification and general properties. *Plant Physiol* 90: 899.
- Lam, E., Kato, N., & Lawton, M. (2001) Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 411: 848-853.
- Lee, J.H., Kim, D.-M., Lim, Y.P., & Pai, H.-S. (2004) The shooty callus induced by suppression of tobacco CHRK1 receptor-like kinase is a phenocopy of the tobacco genetic tumor. *Plant Cell Rep* 23: 397-403.
- Lockshin, R.A., & Zakeri, Z. (2004) Apoptosis, autophagy, and more. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 2405-2419.
- Martineau, B., Houck, C.M., Sheehy, R.E., & Hiatt, W.R. (1994) Fruit-specific expression of the *A. tumefaciens* isopentenyl transferase gene in tomato: effects on fruit ripening and defense-related gene expression in leaves. *Plant J* 5: 11-19.
- Matsumura, H., Nirasawa, S., Kiba, A., Urasaki, N., Saitoh, H., Ito, M., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H., & Terauchi, R. (2003) Overexpression of Bax inhibitor suppresses the fungal elicitor-induced cell death in rice (*Oryza sativa* L.) cells. *Plant J* 33: 425-434.

- McCabe, M.S., Garratt, L.C., Schepers, F., Jordi, W.J., Stoop, G.M., Davelaar, E., van Rhijn, J.H., Power, J.B., & Davey, M.R. (2001) Effects of P<sub>SAG12</sub>-IPT gene expression on development and senescence in transgenic lettuce. *Plant Physiol* 127: 505-516.
- Memelink, J., Hoge, J.H.C., & Schilperoort, R.A. (1987) Cytokinin stress changes the developmental regulation of several defence-related genes in tobacco. *EMBO J* 6: 3579-3583.
- Memelink, J., Linthorst, H.J., Schilperoort, R.A., & Hoge, J.H. (1990) Tobacco genes encoding acidic and basic isoforms of pathogenesis-related proteins display different expression patterns. *Plant Mol Biol* 14: 119-126.
- Mérillion, J.-M., Liu, D., Huguet, F., Chénieux, J.-C., & Rideau, M. (1991) Effects of calcium entry blockers and calmodulin inhibitors on cytokinin-enhanced alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* cell cultures. *Plant Physiol Biochem* 29: 289-296.
- Mlejnek, P., Doležel, P., & Procházka, S. (2003) Intracellular phosphorylation of benzyladenosine is related to apoptosis induction in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Environ* 26: 1723-1735.
- Mlejnek, P., & Kuglik, P. (2000) Induction of apoptosis in HL-60 cells by N<sup>6</sup>-benzyladenosine. *J Cell Biochem* 77: 6-17.
- Mlejnek, P., & Procházka, S. (2002) Activation of caspase-like proteases and induction of apoptosis by isopentenyladenosine in tobacco BY-2 cells. *Planta* 215: 158-166.
- Mok, D.W., & Mok, M.C. (2001) Cytokinin metabolism and action. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 89-118.
- Mok, M.C. 1994. Cytokinins and plant development: an overview. In Cytokinins: chemistry, activity and function. D.W. Mok & M.C. Mok, editors. CRC Press. 155-166.

- Norman, C., Howell, K.A., Millar, A.H., Whelan, J.M., & Day, D.A. (2004) Salicylic acid is an uncoupler and inhibitor of mitochondrial electron transport. *Plant Physiol* 134: 492-501.
- Oakes, S.A., Scorrano, L., Opferman, J.T., Bassik, M.C., Nishino, M., Pozzan, T., & Korsmeyer, S.J. (2005) Proapoptotic BAX and BAK regulate the type 1 inositol trisphosphate receptor and calcium leak from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 105-110.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., & Nicotera, P. (2003) Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 552-565.
- Overmyer, K., Brosche, M., & Kangasjarvi, J. (2003) Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends Plant Sci* 8: 335-342.
- Poupet, A., Cardin, L., Bettachini, B., & Beck, D. (1990) Accumulation de protéines solubles (PR1a protéine) dans des bourgeons de *Nicotiana tabacum* cultivés *in vitro* en présence d'une cytokinine. *C. R. Acad. Sci. Paris* 311: 239-246.
- Rakwal, R., Kumar Agrawal, G., Tamogami, S., Yonekura, M., Prasad Agrawal, B., & Iwahashi, H. (2003) Novel insight into kinetin-inducible stress responses in rice seedlings. *Plant Physiol Biochem* 41: 453-457.
- Reddy, A.S.N. (2001) Calcium: silver bullet in signaling. *Plant Sci* 160: 381-404.
- Romanov, G.A., Kieber, J.J., & Schmölling, T. (2002) A rapid cytokinin response assay in *Arabidopsis* indicates a role for phospholipase D in cytokinin signalling. *FEBS Lett* 515: 39-43.
- 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: 393-399.
- Saunders, M.J., & Hepler, P.K. (1983) Calcium antagonists and calmodulin inhibitors block cytokinin-induced bud formation in *Funaria*. *Dev Biol* 99: 41-49.

- Schumaker, K.S., & Gizinski, M.J. (1993) Cytokinin stimulates dihydropyridine-sensitive calcium uptake in moss protoplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 10937-10941.
- 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: 135-139.
- Scraser-Field, S.A.M.G., & Knight, H. (2003) Calcium : just a chemical switch? *Curr Opin Plant Biol* 6: 500-506.
- Sherameti, I., Shahollari, B., Landsberger, M., Westermann, M., Cherepneva, G., Kusnetsov, V., & Oelmüller, R. (2004) Cytokinin stimulates polyribosome loading of nuclear-encoded mRNAs for the plastid ATP synthase in etioplasts of *Lupinus luteus*: the complex accumulates in the inner-envelope membrane with the  $CF_1$  moiety located towards the stromal space. *Plant J* 38: 578-593.
- Silverman, F.P., Assiamah, A.A., & Bush, D.S. (1998) Membrane transport and cytokinin action in root hairs of *Medicago sativa*. *Planta* 205: 23-31.
- Skoog, F. (1973) A survey of cytokinins and cytokinin antagonists with reference to nucleic acid and protein metabolism. *Biochem Soc Symp* 38: 195-215.
- Swidzinski, J.A., Sweetlove, L.J., & Leaver, C.J. (2002) A custom microarray analysis of gene expression during programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 30: 431-446.
- Szabadkai, G., & Rizzuto, R. (2004) Participation of endoplasmic reticulum and mitochondrial calcium handling in apoptosis: more than just neighborhood? *FEBS Lett* 567: 111-115.
- Takahashi, K., Isobe, M., & Muto, S. (1998) Mastoparan induces an increase in cytosolic calcium ion concentration and subsequent activation of protein kinases in tobacco suspension culture cells. *Biochim Biophys Acta* 1401: 339-346.
- Tepfer, D.A., & Fosket, D.E. (1978) Hormone-mediated translational control of protein synthesis in cultured cells of *Glycine max*. *Dev Biol* 62: 486-497.

- 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: 1271-1281.
- Tucker, E.B., & Boss, W.F. (1996) Mastoparan-induced intracellular  $Ca^{2+}$  fluxes may regulate cell-to-cell communication in plants. *Plant Physiol* 111: 459-467.
- Vermeulen, K., Strnad, M., Havlicek, L., Van Onckelen, H., Lenjou, M., Nijs, G., Van Bockstaele, D.R., & Berneman, Z.N. (2002) Plant cytokinin analogues with inhibitory activity on cyclin-dependent kinases exert their antiproliferative effect through induction of apoptosis initiated by the mitochondrial pathway: determination by a multiparametric flow cytometric analysis. *Exp Hematol* 30: 1107-1114.
- White, P.J., & Broadley, M.R. (2003) Calcium in plants. *Ann Bot* 92: 487-511.
- Xu, Q., & Reed, J.C. (1998) Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast. *Mol Cell* 1: 337-346.
- Yang, H.-M., Zhang, X.-Y., & Wang, G.-X. (2004) Cytosolic calcium oscillation signaling in guard cell. *Plant Sci* 166: 549-556.
- Zuppin, A., Navazio, L., & Mariani, P. (2004) Endoplasmic reticulum stress-induced programmed cell death in soybean cells. *J Cell Sci* 117: 2591-2598.

# **CHAPITRE 5**

## **Discussion**

## 5 Discussion

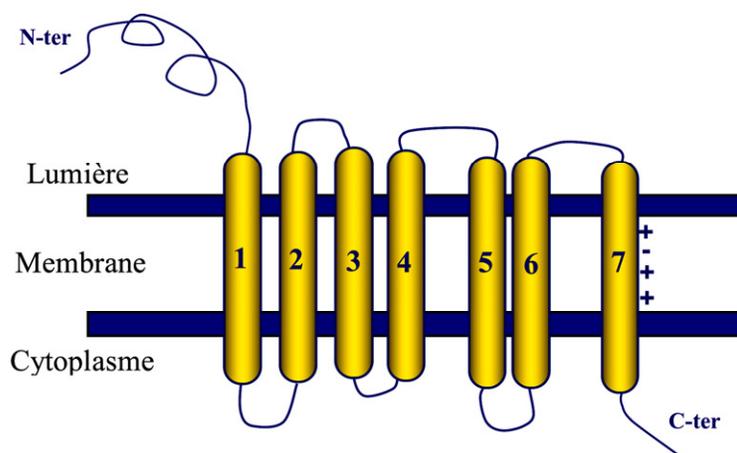
Depuis la découverte que le gène humain *TEGT*, renommé *BI-1*, inhibe la mort cellulaire induite par Bax et que ce gène est présent chez les végétaux, où Bax ou tout autre membre de la famille Bcl-2 sont pourtant absents, bien des pipettes ont été sollicitées et beaucoup d'encre a coulé au sein des biologistes végétaux dont les recherches sont consacrées à l'étude de la PCD, y compris notre laboratoire. L'étude de cette protéine est particulièrement excitante puisqu'il est fort probable qu'elle fasse partie d'un sentier de mort conservé dans l'évolution, nous permettant ainsi d'identifier les mécanismes de base de la PCD présents chez des eucaryotes ancestraux avant la divergence entre le règne animal et végétal. Nous tenterons ici d'intégrer toute l'information disponible à ce jour, incluant les données présentées dans cette thèse ainsi que certains résultats non publiés, pour tenter de dresser un portrait global du mode d'action de BI-1 chez les végétaux.

### 5.1 Le gène *BI-1* est conservé dans l'évolution

À l'époque où nous avons cloné *BnBI-1* et *NtBI-1*, le nombre de séquences de *BI-1* végétaux était encore restreint, puisque seuls *AtBI-1* et *OsBI-1* avaient déjà été clonés, et la séquence d'un homologue de l'orge (*Hordeum vulgare*, *HvBI-1*) est apparue quelques temps plus tard dans les banques de données. Nous avons donc profité de la disponibilité de ces cinq séquences pour tenter de dresser un portrait structural de BI-1, particulièrement les BI-1 végétaux.

Quelques faits intéressants et révélateurs se dégagent de cette analyse. D'abord, le caractère très hydrophobe des séquences protéiques, prédisant jusqu'à sept TM, la relègue sans surprise au rang de protéine membranaire intégrale. La position des domaines hydrophobes semble relativement bien conservée entre les animaux et les végétaux, bien que le 7<sup>e</sup> TM ne soit pas prédit chez les animaux. Chez les végétaux, l'hélice prédite correspondante est toutefois parsemée de résidus hydrophiles lui conférant un caractère amphipatique (voir section 2.2.5.1), et le fait qu'il s'agisse d'une portion transmembranaire n'a pas été prouvé expérimentalement, de sorte que le modèle présenté à la Figure 5-1 ne tient pas compte de

la possibilité que la 7<sup>e</sup> hélice ne soit pas un TM. S'il ne s'agit pas d'un TM, le modèle devrait alors présenter les deux extrémités N- et C-terminales du côté cytoplasmique du RE, puisque nous avons montré que l'extrémité C-terminale est positionnée du côté cytoplasmique (voir Figure 2-5). De plus, cette portion de la protéine, qui demeure tout de même partiellement hydrophobe (tout comme dans les séquences animales), devrait néanmoins être stabilisée dans une quelconque interaction protéine-protéine.



**Figure 5-1** : Schéma récapitulatif de certaines caractéristiques structurales putatives des homologues végétaux de BI-1 au sein des membranes du RE.

La topologie tridimensionnelle de la protéine n'est pas illustrée puisqu'elle est totalement inconnue, mis à part l'orientation du C-terminal. Ce modèle est inspiré de la prédiction pour les BI-1 végétaux de sept TM tel qu'illustré à la Figure 2-1. Tiré de Ouellet (2004).

Certaines données indiquent cependant que l'extrémité C-terminale, bien conservée entre les deux règnes mais particulièrement au sein des végétaux, serait importante pour l'activité de la protéine. En effet, la délétion d'aussi peu que quatre acides aminés en C-terminal de la protéine abolit la protection conférée par BI-1 contre l'effet létal de Bax dans la levure (L. Poulin et L. Brisson, résultats non publiés). Des résultats similaires ont aussi été rapportés pour la délétion de toute la portion hydrophile du C-terminal (14 acides aminés), qui abolit l'effet protecteur de BI-1 contre Bax dans la levure, et ce autant pour un BI-1 d'origine végétale (Kawai-Yamada *et al.*, 2004) ou humaine (Chae *et al.*, 2003). De même, la protection conférée aux cellules végétales par BI-1 contre les stress générés par la présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, d'AS ou du pro-apoptotique Bax nécessite la présence du C-terminal (Kawai-Yamada *et al.*, 2004). De plus, la structure super-enroulée du C-terminal est apparemment

le facteur critique, puisque le remplacement de certains acides aminés de façon à abolir complètement l'enroulement abolit par le fait même l'activité anti-Bax de la protéine dans la levure (Kawai-Yamada *et al.*, 2004). Par ailleurs, la délétion de la portion N-terminale hydrophile de la protéine diminue mais n'abolit pas son action anti-Bax (Kawai-Yamada *et al.*, 2004). Ceci n'est pas surprenant considérant que cette portion de BI-1 est plus divergente, particulièrement entre les protéines d'origine animale et végétale (voir Figure 2-1), suggérant que ce domaine est moins important pour son activité, mais pourrait toutefois avoir une fonction différente et/ou supplémentaire chez les plantes, où cette région est plus longue. Cette idée est supportée par l'existence d'autres séquences plus ou moins éloignées de BI-1 chez *Arabidopsis*, dont les extrémités en N-terminal varient beaucoup par rapport à BI-1. Ces protéines pourraient ainsi constituer une classe de régulateurs de la PCD végétale (Lam *et al.*, 2001), mais les fonctions de ces homologues putatifs restent à être déterminées.

Au-delà de la conservation de la protéine entre les animaux et les végétaux, il semblerait que des séquences protéiques *BI-1-like* existent aussi chez les eucaryotes unicellulaires tels que *S. cerevisiae*, *Plasmodium falciparum* et *Cryptosporidium parvum* (Chae *et al.*, 2003), partageant de 29 à 35% d'identité avec BI-1 humain (Hückelhoven, 2004), ce qui se situe à peu près dans le même ordre de grandeur que les homologies retrouvées entre les séquences animales et végétales (identités de 26-28% par rapport à la protéine BI-1 de la drosophile, et 38-42% par rapport aux BI-1 des mammifères; voir section 2.2.5.1). Il y a aussi des séquences *BI-1-like* chez les procaryotes (Chae *et al.*, 2003), présentant en particulier un motif conservé chevauchant le 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> TM (Hückelhoven, 2004). Il y a même de telles séquences chez plusieurs virus (Chae *et al.*, 2003; Hückelhoven, 2004), suggérant que BI-1 aurait pu être corrompue au cours de l'évolution (tout comme Bcl-2; Takayama *et al.*, 1994) par des pathogènes de façon à reprogrammer la cellule hôte. Cependant, aucun homologue putatif n'a pu être identifié chez *C. elegans* (Chae *et al.*, 2003). Bien que ces homologues lointains ne partagent parfois que 15% d'identité avec BI-1 humain sur toute la longueur protéique, la structure des quatre hélices  $\alpha$  transmembranaires du côté C-terminal y serait apparemment relativement conservée (Chae *et al.*, 2003). Reste à savoir si cette similarité structurale est suffisante pour que ces homologues puissent exercer un effet anti-Bax.

## 5.2 L'effet anti-Bax de BI-1 est conservé dans l'évolution

Au-delà des homologies de séquence entre les protéines BI-1 de diverses origines, la conservation de la structure protéique semble suffisamment grande pour permettre aux BI-1 provenant d'organismes évolutivement très distants d'exercer une fonction similaire. Cette fonction a été évaluée *via* la capacité des BI-1 candidats à inhiber la PCD induite par Bax, le plus souvent dans la levure *S. cerevisiae*, mais il est évident que cela ne constitue pas LA fonction de BI-1 *in vivo*. En effet, chez l'humain, des essais de co-précipitation des deux protéines n'ont pas permis la détection d'interaction protéine-protéine entre BI-1 et Bax (alors que BI-1 et Bcl-2 ont pu être co-précipités; Xu et Reed, 1998), ce qui en vérité aurait été douteux considérant que BI-1 se retrouve aussi chez des organismes où Bax est absent. Il est donc probable que Bax interfère (positivement) avec un sentier de mort commun aux animaux, à la levure et aux plantes, et dans lequel BI-1 interfère, au contraire, négativement. La vérification de l'action anti-Bax d'un candidat donné peut donc constituer un moyen efficace de vérifier sa capacité à exercer une action négative sur le sentier de mort en question.

Toute cette histoire d'action anti-Bax a donc commencé par la démonstration que BI-1 humain inhibe la PCD induite par Bax non seulement dans la levure, mais également dans des cellules humaines (Xu et Reed, 1998). Puis, il a été démontré que les homologues végétaux peuvent eux aussi exercer une fonction anti-Bax dans la levure (Kawai *et al.*, 1999; Sanchez *et al.*, 2000; Chae *et al.*, 2003), dans les cellules végétales (Kawai-Yamada *et al.*, 2001) et parallèlement nous avons démontré que leur action anti-Bax peut s'étendre jusque dans les cellules animales (cellules humaines HEK 293; voir section 2.2.5.2). Plus récemment, des homologues retrouvés chez *S. cerevisiae* et *E. coli* ont également exercé une certaine action anti-Bax, quoi que la qualité des résultats présentés est parfois douteuse (Chae *et al.*, 2003). Néanmoins, cette conservation fonctionnelle de BI-1 provenant d'organismes pourtant distants (et dépourvus de membres de la famille Bcl-2) indique non seulement que ce gène est relativement bien conservé dans l'évolution, mais aussi et surtout qu'il pourrait faire partie d'un sentier de mort dont l'origine évolutive serait très ancienne. Mais les BI-1 endogènes présents chez tous ces organismes ont-ils réellement une fonction anti-PCD dans leur contexte respectif?

### 5.3 BI-1 est un régulateur négatif de la PCD chez des organismes évolutivement distants

Les travaux pionniers de Xu et Reed (Xu et Reed, 1998) ont permis de décrire BI-1 humain comme étant un régulateur négatif de la PCD (du moins dans les modèles de culture cellulaire testés, provenant tous de mammifères). Non seulement BI-1 est au moins aussi efficace que Bcl-2 pour protéger les cellules contre les effets létaux de Bax, mais également contre d'autres inducteurs de l'apoptose tels que l'étoposide et la staurosporine (qui interfèrent avec la prolifération cellulaire en inhibant respectivement la topoisomérase II et des protéines kinases), ainsi que l'absence de certains nutriments (en conditions procurées par la culture en l'absence de sérum fœtal) ou facteur de croissance (absence d'interleukine-3). Cependant, BI-1 est tout aussi inefficace que Bcl-2 pour inhiber l'apoptose induite *via* le récepteur Fas de la famille du TNF. Au-delà de la fonction anti-PCD de BI-1, ces données laissent entendre que BI-1 peut s'insérer dans le même sentier que Bcl-2. En fait, il semble que tout comme Bcl-2, l'ARNm de BI-1 est particulièrement abondant dans certains cas de tumeurs malignes (Walter *et al.*, 1994; Jean *et al.*, 1999; Welsh *et al.*, 2001; Schmits *et al.*, 2002; van 't Veer *et al.*, 2002; Villalva *et al.*, 2002; Grzmil *et al.*, 2003), le désignant ainsi comme un régulateur de la mort cellulaire potentiellement impliqué dans la dérégulation de l'apoptose dans les cellules tumorales (Hückelhoven, 2004).

Du côté des végétaux, nous avons déjà mentionné que Kawai-Yamada et ses collaborateurs (2001) ont démontré que AtBI-1 inhibe les effets de Bax dans des cellules végétales. Cependant, même si les cellules ne sont pas des levures, il s'agit là du même test fonctionnel ayant recours à Bax. Nous fûmes donc les premiers à faire la démonstration de l'action anti-PCD d'une protéine BI-1 végétale dans le contexte d'une PCD végétale, soit l'accélération de la sénescence induite par une disette en sucrose (voir chapitre 3). Parallèlement, l'équipe de H. Matsumura (2003) a rapporté que la surexpression de BI-1 dans des cultures cellulaires de riz (*O. sativa* L.) protège contre la mort induite par un éliciteur ( $\beta$ -glucans provenant de la paroi cellulaire) provenant du champignon pathogène *Magnaporthe grisea*, signifiant que BI-1 peut aussi conférer un effet protecteur contre la PCD induite par des stress biotiques. Plus récemment, il a pu être établi que la

surexpression de BI-1 dans les cellules végétales protège aussi contre des stress induits par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, l'AS ou un choc thermique (Chae *et al.*, 2003; Kawai-Yamada *et al.*, 2004).

Au contraire, l'équipe de Hückelhoven (2003) nous a révélé que la surexpression de BI-1 favorise la pénétration du champignon pathogène *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* dans les cellules de l'épiderme de l'orge (*H. vulgare*). Bien que cela puisse paraître contradictoire par rapport aux données précédentes, elles vont en fait dans le même sens. En effet, en tant que champignon biotrophe, *B. graminis* requiert une cellule hôte vivante pour y pénétrer et s'y multiplier, de sorte que la plus grande efficacité de pénétration du pathogène conférée par la surexpression de BI-1 provient certainement de sa capacité à favoriser la survie de la cellule. D'ailleurs, les cultivars de l'orge n'exprimant pas Mlo, un régulateur négatif de la PCD, sont résistants à ce champignon, mais la surexpression de BI-1 rétablit leur susceptibilité envers le pathogène (Hückelhoven *et al.*, 2003). De même, il semble que cet effet puisse être à large spectre, puisque la surexpression de BI-1 atténue aussi les barrières de l'hôte contre la pénétration du pathogène inapproprié (i.e. contre lequel l'orge est habituellement immunisé) *B. graminis* f. sp. *tritici*, dont l'hôte naturel est plutôt le blé (Eichmann *et al.*, 2004). L'ensemble de ces données démontre donc sans conteste que BI-1 agit en tant que régulateur négatif de la PCD végétale.

Au-delà des mammifères et des plantes, il semblerait que la protéine BI-1 retrouvée chez *S. cerevisiae* puisse aussi protéger cet eucaryote unicellulaire contre la mort induite par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou un choc thermique (Chae *et al.*, 2003). Il apparaît donc que de façon générale, la présence de BI-1 chez un organisme donné puisse lui conférer un effet protecteur contre la PCD. Il sera particulièrement intéressant de vérifier si les protéines BI-1 putatives retrouvées chez certains protozoaires peuvent aussi conférer chez ces eucaryotes inférieurs un effet protecteur contre différents stress.

## 5.4 Modulation de l'ARNm de BI-1 en conditions de stress et de PCD : qu'est-ce que cela veut dire?

Dans les cellules végétales, il semble que BI-1 puisse être induit (au niveau de l'ARNm) par un éventail assez large de stress conduisant ou non à la PCD. Ainsi, des accumulations accrues de l'ARNm ont été induites par des blessures, des pathogènes virulents ou avirulents, et même des pathogènes incompatibles tels que *E. coli* (Sanchez *et al.*, 2000; Hückelhoven *et al.*, 2001; Hückelhoven *et al.*, 2003; Matsumura *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003; nos résultats non publiés). Des observations similaires ont également été obtenues par l'utilisation de composés favorisant des stress oxydatifs tels que le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et l'AS (Kawai-Yamada *et al.*, 2004), des stress induits par des niveaux toxiques de CK (section 4.2.5.3) ou par un choc thermique (Swidzinski *et al.*, 2002). L'augmentation de l'accumulation de l'ARNm de BI-1 chez les végétaux peut donc survenir autant suite à des stress biotiques que suite à des stress abiotiques.

L'induction de la transcription de *BI-1* (ou la stabilisation de son ARNm) confère probablement une certaine protection contre ces stress, en particulier les stress biotiques où la surexpression de BI-1 permet effectivement d'augmenter la survie cellulaire face à certains pathogènes (Hückelhoven *et al.*, 2003; Matsumura *et al.*, 2003). Il est donc probable que BI-1 soit impliquée dans la restriction de la propagation des lésions dans le cours de la HR et dans la survie induite par les champignons biotrophes [voir les travaux de Hückelhoven (2003) décrits plus haut]. De même, nous avons observé une augmentation de l'accumulation de BI-1 au niveau protéique dans des cultures de tabac stressées par un apport exogène de CK (section 4.2.5.2). Le profil temporaire ou soutenu de l'augmentation en fonction de l'intensité du stress suggère fortement que l'induction de BI-1 contribue à la survie des cellules. Cependant, il est également possible que dans certains cas, l'augmentation « naturelle » de l'accumulation de l'ARNm de BI-1 par un stress donné n'ait pas d'effet sur la viabilité cellulaire, même si la surexpression de BI-1 *via* un transgène puisse conférer une protection contre ces mêmes stress. Par exemple, une augmentation de l'accumulation du messager de BI-1 et de d'autres gènes de défense chez *Lycopersicon esculentum* (tomate) n'empêche pas les plantes de succomber à l'assaut concerté du *cucumber mosaic virus* et de son ARN satellite D (Xu *et al.*, 2003), bien qu'il

n'ait pas été testé si la surexpression de BI-1 aurait pu avoir un effet protecteur. D'autre part, bien que l'accumulation du messager de BI-1 soit augmentée en présence de doses toxiques de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et d'AS ou par un choc thermique dans les cultures cellulaires, celles-ci succombent tout de même à ces traitements (Swidzinski *et al.*, 2002; Kawai-Yamada *et al.*, 2004). Similairement, nous avons observé que l'accumulation du messager de NtBI-1 est augmentée face à des doses toxiques de CK dans des cultures cellulaires ou au cours de la HR chez le tabac en réponse au TMV, tous deux conduisant pourtant à une mort rapide (chapitre 4). Au contraire, un éliciteur fongique entraîne une diminution de l'ARNm OsBI-1 dans des suspensions de riz (Matsumura *et al.*, 2003). Il est donc possible que dans certaines situations de PCD, plusieurs réponses antagonistes soient activées parallèlement, conduisant à la fois à l'activation de sentiers de mort et de survie. La mort survenant très rapidement, les mécanismes de survie (dont une augmentation de l'accumulation de la protéine BI-1) s'avèrent inefficaces, possiblement parce qu'ils ne sont pas activés assez rapidement. Au contraire, une expression constitutive plus élevée de la protéine BI-1 au moment où survient le stress peut s'avérer suffisante pour bloquer l'induction de la PCD, similairement à la défense immunitaire acquise des mammifères, où le niveau élevé d'anticorps envers un pathogène ayant déjà été rencontré prévient toute invasion ultérieure par ce pathogène.

Dans le cadre de notre étude portant sur l'induction de NtBI-1 par les CK, nous avons tenté de corrélérer l'expression du messager avec celle de la protéine. Or, nous avons observé que le messager est induit seulement à des concentrations toxiques, où l'induction de la protéine est peu ou pas détectable. Pourtant, la protéine est bel et bien surexprimée à des concentrations non toxiques mais suffisantes pour induire un stress (évalué par l'accumulation de l'ARNm PR1a et l'arrêt de croissance; voir section suivante). Nous avons voulu vérifier si une situation semblable se produisait dans le cas de l'AS, dont les effets sur BI-1 semblent contradictoires. En effet, le traitement de plantules d'orge avec un analogue de l'AS pouvant induire la résistance envers les pathogènes (effet non toxique) a entraîné une diminution de l'accumulation de l'ARNm HvBI-1 (Hückelhoven *et al.*, 2003), alors que dans des cellules de tabac en culture, une dose d'AS non toxique mais suffisante pour induire l'accumulation de l'ARNm PR1a n'influence pas l'accumulation du messager ni de la protéine NtBI-1 (chapitre 4). Au contraire, une dose toxique induit le messager

(Kawai-Yamada *et al.*, 2004), que nous avons difficilement pu corrélérer avec une augmentation de la protéine (section 4.2.5.1). Même son de cloche du côté du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, qui permet une certaine induction du messager dans des cultures cellulaires (Kawai-Yamada *et al.*, 2004), mais notre analyse de l'accumulation de la protéine n'a révélé que sa disparition, conjointement avec la mort cellulaire. Finalement, nous n'avons pas réussi à détecter d'augmentation de la protéine NtBI-1 dans des cellules en culture soumises à un choc thermique, pour lequel une augmentation de l'accumulation de l'ARNm AtBI-1 (dans des suspensions d'*Arabidopsis*) a déjà été rapportée (Swidzinski *et al.*, 2002), bien que ces résultats proviennent de puces d'ADN et n'ont pas été confirmés par d'autres méthodes.

Il semble donc qu'un niveau élevé de la protéine BI-1 ne coïncide pas nécessairement avec un niveau élevé de son ARNm et cela semble particulièrement vrai dans le cas où les cellules sont en train d'exécuter un programme de mort. Dans ce dernier cas, le niveau élevé du messager n'est probablement que le reflet d'une tentative de survie de la part de la cellule. Il faut donc être très prudent dans nos interprétations et s'assurer d'évaluer la viabilité conjointement avec l'expression du gène, puisque l'augmentation du messager n'est pas d'une très grande utilité à la cellule si cela ne s'accompagne pas d'une augmentation de la protéine. De plus, il ne faut pas sous-estimer l'existence de mécanismes de régulation post-transcriptionnels de BI-1 (voir section 5.7).

## 5.5 BI-1, autophagie et sénescence

La sénescence est le stade final du développement d'un organe qui marque la transition entre une période d'assimilation du carbone et de l'azote vers une période de catabolisme et de transfert des nutriments vers des organes puits (voir section 1.4.1.7). Ce processus de recyclage fait appel à l'autophagie, un processus également impliqué dans la survie cellulaire en période de disette (Lockshin et Zakeri, 2004). En effet, l'utilisation des réserves protéiques, amylacées et lipidiques peut permettre à la cellule de maintenir certains sentiers essentiels à sa survie pendant une assez longue période. L'autophagie peut donc être induite par une carence en nutriments et la plupart des études ont utilisé une carence en carbone (*carbon starvation*; CS) pour décrire ce processus. Beaucoup d'entre elles ont fait

appel à des cultures cellulaires auxotrophes envers une source de carbone, le plus souvent le sucrose, dont l'élimination du milieu de culture permet une induction relativement synchronisée du processus dans la population cellulaire (Contento *et al.*, 2004).

L'autophagie représente donc un sentier de survie pour la cellule et le recyclage d'un organe entier en ayant recours à ce processus représente également un avantage évolutif pour la plante. D'ailleurs, l'autophagie n'est pas un processus exclusif aux plantes et elle est essentielle à la maintenance de caractéristiques « de jeunesse » (par opposition au vieillissement) et à une vie prolongée autant chez les animaux que chez des eucaryotes unicellulaires comme la levure (Lockshin et Zakeri, 2004). Cependant, dans une situation où la disette se prolonge et que la cellule épuise ses réserves, le nom donné à ce processus, dérivé de mots grecs et signifiant « autodigestion », prend tout son sens. La cellule arrive à un point de non retour, le dernier stade de cette forme de PCD, caractérisé entre autres par la dégradation de l'ADN génomique. Il va de soi que la destruction du matériel génétique marque le caractère irréversible du processus.

Au cours de l'autophagie végétale, que ce soit induit par le CS ou dans le cours de la sénescence naturelle des feuilles, une certaine proportion des gènes est différenciellement exprimée de façon à répondre aux nouveaux besoins cellulaires. Outre les gènes impliqués dans le catabolisme et le recyclage des nutriments, on retrouve l'induction d'un grand nombre de gènes traditionnellement associés aux stress et aux réactions de défense. Par exemple, la surexpression d'enzymes impliquées dans la détoxification des ROS comme les superoxyde dismutases et les catalases peuvent contribuer à minimiser les stress oxydatifs pendant le processus (Chandlee, 2001). Dans une étude récente ayant analysé les profils de transcription associés à un CS dans des suspensions cellulaires d'*Arabidopsis*, il a été rapporté que 15% des gènes dont l'expression était significativement majorée sont connus ou prédits être impliqués dans la survie cellulaire et les réactions de défense, suggérant leur implication dans une réponse non spécifique envers les stress associés au CS (Contento *et al.*, 2004). Il est en effet logique que la cellule induise ces mécanismes de survie, qui lui permettent probablement de ne pas « mourir de stress » au cours du processus autophagique visant à ne pas « mourir de faim ».

Il semble donc que la cellule doive adopter des mécanismes de survie de façon à ne pas trépasser avant d'avoir fait une utilisation maximale et optimale de ses réserves. En ce sens, nous avons démontré que le niveau de BI-1 dans des lignées cellulaires de tabac influence leur résistance face à la sénescence naturelle ou induite par une disette en sucrose (chapitre 3). En effet, des lignées cellulaires de tabac chez lesquelles un ARNm antisens de NtBI-1 réduit substantiellement l'accumulation de la protéine sont moins résistantes à la PCD induite par un CS que les lignées contrôles. Il apparaît donc probable que BI-1 soit impliquée dans la survie cellulaire au cours du processus. Cependant, il ne semble pas que son expression ait besoin d'être majorée puisque nous n'avons pas détecté d'augmentation du niveau de la protéine pendant le CS (résultats non publiés). De plus, aucune des études de puces d'ADN ayant analysé les niveaux de transcription au cours de la sénescence naturelle (Swidzinski *et al.*, 2002; chapitre 3) ou induite par un CS (Contento *et al.*, 2004) n'ont rapporté de modulation du niveau d'expression de l'ARNm BI-1. Au contraire, nous avons détecté une diminution de l'accumulation de la protéine concomitante avec les premiers signes d'autophagie, jusqu'à l'obtention d'un niveau indétectable précédant ou à peu près en même temps que la perte de viabilité cellulaire et/ou la fragmentation de l'ADN nucléaire (chapitre 4 et résultats non montrés). Il se pourrait donc que l'élimination de BI-1 marque l'un des points de non-retour du processus autophagique.

Dans le même ordre d'idée, la diminution de l'expression de BI-1 dans des cellules humaines *via* un ARNm antisens induit spontanément l'apoptose (Xu et Reed, 1998) et l'expression du messenger semble être ubiquitaire dans la plupart des tissus, autant chez les animaux (Xu et Reed, 1998) que chez les végétaux (Kawai *et al.*, 1999; chapitre 2), indiquant que ce gène aurait une fonction vitale. Cependant, des souris knockout *bi-1<sup>-/-</sup>* ont pu être générées et ne présentaient pas d'anormalité évidente d'un point de vue macroscopique ou suivant une inspection histologique (Chae *et al.*, 2004), conduisant les auteurs de l'étude à conclure que le gène n'est pas essentiel, bien qu'ils aient mis en évidence une susceptibilité accrue envers certains stress. La caractérisation de plantes dépourvues du gène *BI-1* n'a pas encore été publiée, mais l'équipe de David Gilchrist a rapporté dans une communication (poster) présentée à l'été 2004 au congrès de l'*American Society of Plant Biologists* (Plant Biology 2004, Lake Buena Vista, Fl, USA, 24-28 juillet) que la suppression de LeBI-1 chez la tomate *via* un messenger antisens entraîne un

phénotype *lesion mimic* (i.e. l'apparition spontanée de lésions nécrotiques rappelant la HR) et des retards de croissance importants. Il semble donc que bien que des plantes ou des animaux puissent se développer en l'absence ou quasi-absence de la protéine BI-1, cette dernière est strictement requise pour le contrôle négatif de la PCD.

Le fait que la PCD de type sénescence soit favorisée en l'absence de BI-1 (chapitre 3) suggèrent fortement son implication dans le contrôle négatif de ce type de PCD. L'induction de BI-1 par les CK (chapitre 4) renforce davantage cette idée, puisque les cytokinines peuvent exercer un effet anti-sénescence. Dans ce contexte, il ne semble pas farfelu de supposer que BI-1 soit impliquée dans l'effet anti-sénescence des CK. Nous avons également observé que l'accumulation accrue de la protéine NtBI-1 est accompagnée de l'accumulation de l'ARNm PR1a, encodant une protéine traditionnellement associée aux stress biotiques. Cependant, l'induction des gènes *PR* et de d'autres gènes associés aux stress en présence de niveaux de CK plus élevés que la normale a été rapportée maintes fois dans la littérature, autant dans des systèmes *in vitro* (Memelink *et al.*, 1987; Poupet *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 2004) que dans des tissus ou plantes entières (Memelink *et al.*, 1990; Martineau *et al.*, 1994; Rakwal *et al.*, 2003). L'accumulation des gènes de stress est dans certains cas, mais pas tous, associée à un effet toxique inattendu des CK (Ainley *et al.*, 1993; Martineau *et al.*, 1994; McCabe *et al.*, 2001; Rakwal *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004). Il se pourrait donc que dans certaines circonstances, les CK puissent induire un stress pouvant aller jusqu'à la létalité, de façon concomitante avec l'induction de mécanismes de protection faisant appel à BI-1 et à d'autres protéines traditionnellement connues pour leur implication dans les RD envers les pathogènes.

## 5.6 Toxicité des CK

La toxicité des CK est associée à des cellules en division, ou à tout le moins présentant un métabolisme actif, par opposition à des cellules quiescentes (Ainley *et al.*, 1993; McCabe *et al.*, 2001; Carimi *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004). Par exemple, dans les feuilles adultes en sénescence ou non, les CK ne sont pas toxiques mais vont plutôt faire la promotion d'un maintien de caractéristiques « de jeunesse », alors que les jeunes feuilles encore en

croissance sont plus susceptibles de réagir par le développement de chloroses et d'une sénescence prématurée (Ainley *et al.*, 1993; McCabe *et al.*, 2001). Dans les cultures cellulaires de *D. carota* L., les cellules en phase exponentielle de croissance sont les plus susceptibles à l'induction de la PCD lors d'un apport exogène de CK (Carimi *et al.*, 2003). La concentration endogène en CK dans un tissu pourrait peut-être aussi affecter sa réponse envers un apport exogène, bien que cela n'ait jamais été testé. En ce sens, la portion aérienne d'une plante ne perçoit pas les CK de la même façon que le système racinaire (où les CK sont synthétisées), ce dernier étant fortement réprimé par les CK, contrairement à la stimulation du développement de la partie aérienne (Werner *et al.*, 2003).

Il est donc probable que l'expression différentielle de la machinerie de perception et du métabolisme des CK dans différents tissus ou cellules influence la façon dont est gérée un apport exogène de l'hormone. D'ailleurs, la toxicité des CK dans les cultures cellulaires de tabac semble étroitement associée à leur métabolisme intracellulaire et particulièrement leur conversion en nucléotide (par la phosphorylation; Mlejnek *et al.*, 2003), qui survient probablement par les enzymes du métabolisme des purines, comme l'Adk (Jameson, 1994; Mok et Mok, 2001). Or, on peut supposer que ces enzymes sont plus abondantes dans des cellules en division (ou à tout le moins très actives métaboliquement) que dans des cellules quiescentes, expliquant peut-être en partie l'effet différentiel des CK selon le statut métabolique. Ce point est également supporté par le fait que les quatre CK testées n'avaient pas toutes la même « efficacité », à une concentration donnée, d'induire un stress ou la PCD. En particulier, nous avons constaté que les plus efficaces étaient celles pourvues de dérivés phénoliques en position N<sup>6</sup> (Bap et Kin; voir Figure 1-11), probablement parce qu'elles ne sont pas métabolisées par les CKX, contrairement à celles dont la substitution est un isoprenoïde (iPA, Zea; Armstrong, 1994).

## 5.7 Régulation post-transcriptionnelle de BI-1

Il a été souligné au chapitre 4 que la régulation de BI-1 semble être post-transcriptionnelle, du moins dans certains cas. Par exemple, au cours de la sénescence naturelle ou induite par un CS, le niveau relatif du messager ne semble pas trop affecté, alors que la protéine

disparaît. D'un autre côté, des concentrations de CK non toxiques mais induisant un stress entraînent une modulation à la hausse de l'accumulation de la protéine, sans altérer le niveau du messenger. De même, nous avons pu détecter une augmentation de l'accumulation de la protéine AtBI-1 dans des plantules d'*Arabidopsis* (résultats non montrés), dans des conditions où une analyse transcriptomique avec des puces d'ADN Affymetrix n'a pas rapporté d'altération du messenger (Rashotte *et al.*, 2003). Dans ce dernier cas, il est d'ailleurs reconnu que les CK peuvent stimuler la synthèse protéique en rendant un plus grand nombre de messagers disponibles pour la traduction. Ceci pourrait découler de la modification de la structure secondaire de l'ARNm entraînant son « dévoilement » (*unmasking*), particulièrement dans la région 5' non traduite (Sherameti *et al.*, 2004) ou dans le segment poly(A) (Jackowski *et al.*, 1987). De plus, la formation de polyribosomes a aussi été associée au contrôle traductionnel par les CK (Ohya et Suzuki, 1988; Sherameti *et al.*, 2004). En particulier, les CK stimulent chez *Lupinus luteus* (lupin) l'augmentation du taux de synthèse de trois sous-unités de l'ATP synthase sans changement au niveau de l'accumulation de leur ARNm respectif (Kusnetsov *et al.*, 1994). Récemment, Sherameti et collaborateurs (2004) ont démontré que cela était dû à l'association spécifique de ces ARNm avec des polyribosomes. Bien que spéculatif, il est possible qu'un tel phénomène soit responsable de l'augmentation de l'accumulation de la protéine NtBI-1 sans augmentation de son ARNm.

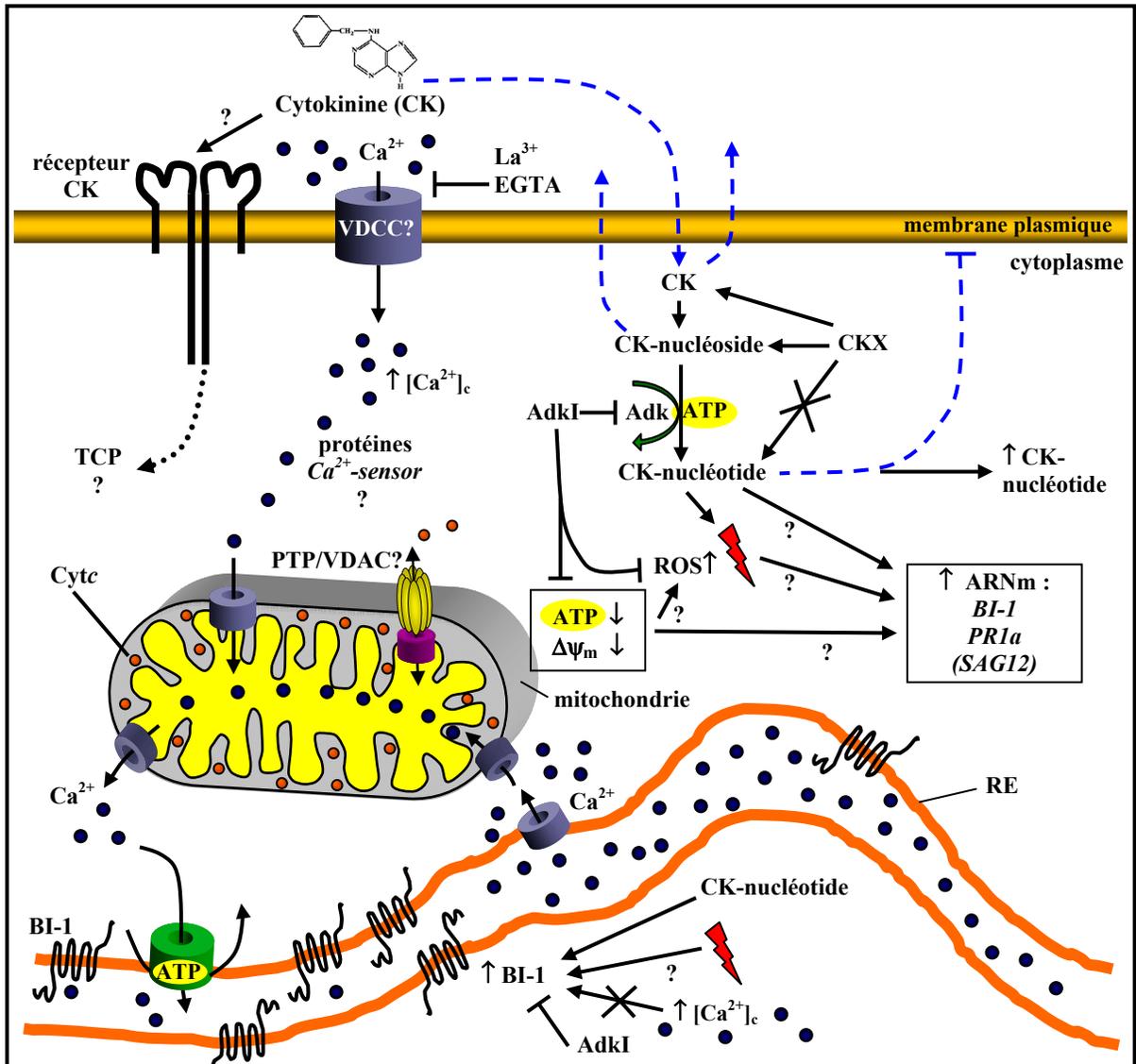
### **5.8 Vers un mécanisme d'action de BI-1 : régulation des flux de Ca<sup>2+</sup> intracellulaires**

L'action de la protéine Bax pouvant être accomplie *via* la production de ROS, il se pourrait que BI-1 exerce son action antagoniste par la suppression de la production de ROS ou leur détoxification, d'autant plus que les stress oxydatifs générant des ROS peuvent favoriser l'accumulation de l'ARNm de BI-1 (Kawai-Yamada *et al.*, 2004). Pourtant, aucune différence significative dans la production de ROS n'a été observée chez des plantes d'*A. thaliana* ou leur protoplastes exprimant la protéine Bax seule ou conjointement avec AtBI-1 (Baek *et al.*, 2004; Kawai-Yamada *et al.*, 2004). Il semble donc que l'effet anti-Bax de BI-1 ait une autre origine et l'identification de ce mécanisme pourra potentiellement expliquer l'effet anti-PCD général de BI-1.

Les données disponibles actuellement laissent présager que ce mécanisme universel aurait à voir avec la régulation des flux de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaires. En effet, la localisation de BI-1 au sein des membranes du RE, un réservoir de  $\text{Ca}^{2+}$ , suggérait déjà un lien avec cet ion. L'importance des flux de  $\text{Ca}^{2+}$  entre le RE et les mitochondries chez les animaux est maintenant bien établie et nous savons également que certaines protéines membres de la famille Bcl-2 peuvent influencer ces mouvements ioniques. Notamment, Bcl-2 contribue à diminuer la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ , alors que Bax l'augmente (voir section 1.3.5.3). Ainsi, lors d'un stress ou signal apoptotique favorisant la sortie du  $\text{Ca}^{2+}$  du RE, un surplus de Bcl-2 ou de Bax va respectivement empêcher ou favoriser des surplus de  $\text{Ca}^{2+}$  aux mitochondries et conséquemment influencer le sort de la cellule. Or, BI-1 antagonise Bax indirectement, de sorte que nous avons depuis un certain temps élaboré l'hypothèse que BI-1 pourrait agir similairement à Bcl-2 et favoriser une plus faible  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ , ce qui expliquerait son action à large spectre autant chez les animaux que chez les végétaux. Cette hypothèse semble avoir également germé dans d'autres têtes, qui l'ont même vérifiée et confirmée chez la souris (Chae *et al.*, 2004). Des souris *knockout bi-1<sup>-/-</sup>* sont plus susceptibles à l'apoptose induite par des agents conduisant à des stress du RE, tels que la thapsigargine (qui inhibe la pompe  $\text{Ca}^{2+}$ /ATPase du RE, la SERCA) ou la tunicamycine (qui inhibe la glycosylation), mais non envers des stimulateurs de sentiers apoptotiques passant uniquement par les mitochondries ou les récepteurs de morts (TNF/Fas). Similairement, la surexpression de BI-1 dans les cellules murines protège contre l'apoptose induite par des stress au RE et corrèle avec l'inhibition de l'activation de Bax et sa translocation aux mitochondries, la préservation du  $\Delta\Psi_m$  et la suppression de l'activation des caspases. Finalement, la surexpression de BI-1 réduit la quantité de  $\text{Ca}^{2+}$  pouvant être relâchée du RE (Chae *et al.*, 2004).

Les similarités entre BI-1 et Bcl-2 quant à certains aspects de leur mode d'action anti-PCD laissent croire que les deux protéines font partie du même sentier, d'autant plus qu'elles peuvent être co-précipitées lorsque exprimées dans des cellules humaines (Xu et Reed, 1998). De plus, même si Bcl-2 et Bax sont absentes du règne végétal, elles peuvent y être fonctionnelles lorsque exprimées sous forme de transgènes (voir section 1.4.4.2), suggérant qu'elles pourraient interférer avec le sentier dont fait partie BI-1. Bien que les données concernant BI-1 et la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$  proviennent d'un modèle animal, il est fort probable que BI-1 exerce une action similaire chez les végétaux et potentiellement les autres organismes où

il a été identifié. Le sentier de mort universel dans lequel BI-1 tiendrait un rôle clé impliquerait alors la régulation des flux de  $\text{Ca}^{2+}$  entre le RE et les mitochondries, par un moyen encore inconnu. La présence d'un tel sentier chez les végétaux est d'autant possible que certains éléments qui le composeraient sont effectivement présents chez les végétaux. Ces éléments ayant été détaillés à la section 1.4.2.4, ils ne seront pas repris ici, mais sont intégrés à la Figure 5-2, qui résume nos connaissances des relations entre les CK, le  $\text{Ca}^{2+}$  et BI-1. Il est à noter que les modulations de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  n'affectent pas l'accumulation de la protéine BI-1 dans des cultures cellulaires de tabac (section 4.2.5.7), mais nous ne savons rien d'un effet potentiel sur son activité.



**Figure 5-2 : Résumé des relations entre les CK, le  $\text{Ca}^{2+}$  et BI-1 chez les animaux et/ou les végétaux.**

Le ? qui accompagne certains éléments souligne le fait que ces données sont extrapolées à partir de d'autres modèles animaux ou végétaux ou carrément spéculées. Les flèches pointillées bleues illustrent la possibilité de transport des CK à travers la membrane plasmique. Dans des cellules de tabac en culture, un apport exogène de CK (Bap ou Kin) mais non d'adénine entraîne un influx de  $\text{Ca}^{2+}$  de l'apoplaste vers le cytosol, qui est inhibé par la présence d'un chélateur de  $\text{Ca}^{2+}$  (EGTA) ou d'un inhibiteur de canaux cationiques ( $\text{La}^{3+}$ ). Chez certains bryophytes, l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  aurait lieu *via* un *voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channel* (VDCC). Chez les plantes supérieures, la signalisation par les CK implique aussi leur liaison à leur récepteur au niveau de la membrane plasmique, puis une cascade de phosphorylation *via* le *two-component phosphorelay* (TCP), qui pourrait conduire à la modulation de certains gènes dont BI-1, bien qu'aucune donnée ne supporte cette possibilité pour l'instant. Les CK pénètrent dans la cellule, où elles sont rapidement converties en nucléosides et nucléotides, cette dernière forme étant séquestrée dans la cellule et s'y accumule sans apparente conversion en une autre forme, d'autant plus qu'elle n'est pas un substrat pour la CK oxydase/déshydrogénase (CKX), principale responsable de l'inactivation irréversible des CK. La phosphorylation des CK pourrait être entre autres accomplie par l'adénosine kinase (Adk), puisqu'elle est partiellement compromise par un inhibiteur de l'Adk (AdkI). Pendant ce temps, le niveau d'ATP diminue de façon plus ou moins importante selon la concentration de CK, probablement dû à une combinaison d'une consommation excessive par la phosphorylation des CK et de dysfonctions mitochondriales. D'ailleurs, la diminution du potentiel membranaire mitochondrial ( $\Delta\psi_m$ ) a été observée dans des cellules humaines soumises à de hautes concentrations de CK, ainsi que chez les végétaux au cours de diverses formes de PCD. La chute de l'ATP est temporellement suivie d'une augmentation des ROS, lesquels sont reconnus pour leur implication dans la signalisation en conditions de stress et pourraient ainsi être impliqués dans l'induction de BI-1 et des autres gènes dont l'expression est majorée en présence des CK. Les CK favorisent aussi la traduction de BI-1 à partir des ARNm déjà en place (ou l'augmentation de la stabilité de BI-1). Cependant, l'augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  ne constitue pas un signal pour la surexpression de BI-1, mais BI-1 pourrait influencer la signalisation par le  $\text{Ca}^{2+}$  en conditions de stress. En effet, chez les animaux, BI-1 agit similairement à Bcl-2 et de façon antagoniste à Bax pour favoriser un plus faible niveau de  $\text{Ca}^{2+}$  au RE et conséquemment une plus faible sortie de  $\text{Ca}^{2+}$  du RE vers le cytosol en situation de stress. Chez les mammifères, le  $\text{Ca}^{2+}$  évacué du RE ou en provenance de l'apoplaste peut être tamponné par les mitochondries (des fluctuations de  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  suite à certains stress ont aussi été rapportées chez les végétaux), mais un excès peut entraîner l'ouverture du PTP [dont pourrait faire partie le *voltage-dependent anion channel* (VDAC), récemment identifié chez les végétaux] et la sortie de l'excès de  $\text{Ca}^{2+}$  et de d'autres molécules comme le cytochrome *c* (Cytc) qui participent à l'induction de la PCD (chez les végétaux, la corrélation entre la sortie du Cytc et la PCD est parfois observable, mais une relation de cause à effet n'a jamais été établie). L'ouverture plus ou moins prolongée du PTP s'accompagne aussi de la perte du  $\Delta\psi_m$  (un phénomène également provoqué chez les végétaux par des inducteurs de la PCD) et donc d'une réduction de la synthèse de l'ATP.

## 5.9 Conclusions générales et perspectives

L'ensemble des données accumulées au cours des dernières années, incluant celles constituant le cœur de cette thèse, indiquent que BI-1 est un régulateur négatif de la PCD, agissant possiblement au sein d'un sentier de mort ancestral évolutivement conservé chez les eucaryotes. L'élucidation des mécanismes d'action de cette protéine pourra donc nous permettre de repérer un sentier de mort présent non seulement chez les végétaux, mais aussi potentiellement chez l'ensemble des eucaryotes.

Bien que les données générées dans le cadre de cette thèse nous aient fourni de précieuses informations concernant BI-1, elles ont aussi engendré beaucoup de questions. Ainsi, la sénescence accélérée des lignées de tabac sous-exprimant BI-1 (lignées AS) et l'augmentation de l'accumulation de BI-1 par les CK suggèrent l'implication de cette protéine dans le contrôle de la sénescence. Ce point pourrait être vérifié par l'expression de BI-1 sous le contrôle du promoteur de *SAG12*, de façon à surexprimer la protéine spécifiquement au cours de la sénescence. Les données obtenues avec les lignées AS ouvrent également la possibilité que BI-1 soit associée à la régulation de l'autophagie, ce qui pourrait constituer une piste de recherche intéressante. Un autre point majeur à vérifier serait l'impact de la modulation à la hausse ou à la baisse de l'accumulation de BI-1 sur la PCD induite par les CK, mais aussi la PCD induite par des agents qui affectent la  $[Ca^{2+}]_c$  de différentes manières. De façon plus générale, l'identification de partenaires protéiques de BI-1 pourrait être fort utile à l'élucidation du sentier dans lequel elle intervient.

## Bibliographie

- Abraham, M.C., & Shaham, S. (2004) Death without caspases, caspases without death. *Trends Cell Biol* 14: 184-193.
- Adams, J.M., & Cory, S. (2001) Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci* 26: 61-66.
- Agrawal, G.K., Iwahashi, H., & Rakwal, R. (2003) Small GTPase 'Rop': molecular switch for plant defense responses. *FEBS Lett* 546: 173-180.
- Ainley, W.M., McNeil, K.J., Hill, J.W., Lingle, W.L., Simpson, R.B., Brenner, M.L., Nagao, R.T., & Key, J.L. (1993) Regulatable endogenous production of cytokinins up to 'toxic' levels in transgenic plants and plant tissues. *Plant Mol Biol* 22: 13-23.
- Allen, G.J., Muir, S.R., & Sanders, D. (1995) Release of  $Ca^{2+}$  from individual plant vacuoles by both  $InsP_3$  and cyclic ADP-ribose. *Science* 268: 735-737.
- Allen, R.F. (1923) A cytological study of infection of Baart and Kanred wheats by *Puccinia graminis tritici*. *J Agric Res* 23: 131-152.
- Alvarez, M.E. (2000) Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Mol Biol* 44: 429-442.
- Annis, M.G., Yethon, J.A., Leber, B., & Andrews, D.W. (2004) There is more to life and death than mitochondria: Bcl-2 proteins at the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 1644: 115-123.
- Antonsson, B. (2001) Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family "killer-proteins" and their victim the mitochondrion. *Cell Tissue Res* 306: 347-361.
- Apel, K., & Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species : metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55: 373-399.
- Aravind, L., Dixit, V.A., & Koonin, E.V. (2001) Apoptotic molecular machinery: vastly increased complexity in vertebrates revealed by genome comparisons. *Science* 291: 1279-1284.
- Aravind, L., Dixit, V.M., & Koonin, E.V. (1999) The domains of death: evolution of the apoptosis machinery. *Trends Biochem* 24: 47-53.
- Armstrong, D.J. 1994. Cytokinin oxidase and the regulation of cytokinin degradation. In Cytokinins: chemistry, activity and function. D.W. Mok & M.C. Mok, editors. CRC Press. 139-154.
- 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: 46696-46705.
- Ashkenazi, A., & Dixit, V.M. (1997) Death receptors : signaling and modulation. *Science* 281: 1305-1308.
- Aubert, S., Gout, E., Bigny, 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: 1251-1263.
- Babiychuk, E., Cottrill, P.B., Storozhenko, S., Fuangthong, M., Chen, Y., O'Farrell, M.K., Van Montagu, M., Inze, D., & Kushnir, S. (1998) Higher plants possess two structurally different poly(ADP-ribose) polymerases. *Plant J* 15: 635-645.

- Baek, D., Nam, J., Koo, Y.D., Kim, D.H., Lee, J., Jeong, J.C., Kwak, S.S., Chung, W.S., Lim, C.O., Bahk, J.D., Hong, J.C., Lee, S.Y., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H., & Yun, D.J. (2004) Bax-induced cell death of *Arabidopsis* is mediated through reactive oxygen-dependent and -independent processes. *Plant Mol Biol* 56: 15-27.
- 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: 573-583.
- Balk, J., & Leaver, C.J. (2001) The PET1-CMS mitochondrial mutation in sunflower is associated with premature programmed cell death and cytochrome *c* release. *Plant Cell* 13: 1803-1818.
- Balk, J., Leaver, C.J., & McCabe, P.F. (1999) Translocation of cytochrome *c* from the mitochondria to the cytosol occurs during heat-induced programmed cell death in cucumber plants. *FEBS Lett* 463: 151-154.
- Bedinger, P. (1992) The remarkable biology of pollen. *Plant Cell* 4: 879-887.
- Beers, E.P., & McDowell, J.M. (2001) Regulation and execution of programmed cell death in response to pathogens, stress and developmental cues. *Curr Opin Plant Biol* 4: 561-567.
- Beligni, M.V., Fath, A., Bethke, P.C., Lamattina, L., & Jones, R.L. (2002) Nitric oxide acts as an antioxidant and delays programmed cell death in barley aleurone layers. *Plant Physiol* 129: 1642-1650.
- Benhamou, N., & Picard, K. (2000) La résistance induite : une nouvelle stratégie de défense des plantes contre les agents pathogènes. *Phytoprotection* 80: 137-168.
- Berridge, M.J. (2002) The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium* 32: 235-249.
- Bestwick, C.S., Bennett, M.H., & Mansfield, J.W. (1995) Hrp mutant of *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* induces cell wall alterations but not membrane damage leading to the hypersensitive reaction in lettuce. *Plant Physiol* 108: 503-516.
- Bethke, P.C., & Jones, R.L. (2001) Cell death of barley aleurone protoplasts is mediated by reactive oxygen species. *Plant J* 25: 19-29.
- Bethke, P.C., Lonsdale, J.E., Fath, A., & Jones, R.L. (1999) Hormonally regulated programmed cell death in barley aleurone cells. *Plant Cell* 11: 1033-1046.
- Bettiga, M., Calzari, L., Orlandi, I., Alberghina, L., & Vai, M. (2004) Involvement of the yeast metacaspase Yca1 in *ubp10*Delta-programmed cell death. *FEMS Yeast Res* 5: 141-147.
- Bindschedler, L.V., Minibayeva, F., Gardner, S.L., Gerrish, C., Davies, D.R., & Bolwell, G.P. (2001) Early signalling events in the apoplastic oxidative burst in suspension cultured French bean cells involve cAMP and Ca<sup>2+</sup>. *New Phytol* 151: 185-194.
- Blatt, M.R. (2000) Ca<sup>2+</sup> signalling and control of guard-cell volume in stomatal movements. *Curr Opin Plant Biol* 3: 196-204.
- Blumwald, E., Aharon, G.S., & Lam, B.C.H. (1998) Early signal transduction pathways in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci* 3: 342-346.
- Boehning, D., Patterson, R.L., Sedaghat, L., Glebova, N.O., Kurosaki, T., & Snyder, S.H. (2003) Cytochrome *c* binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol* 5: 1051-1061.
- Bolwell, G.P. (1992) A role for phosphorylation in the down-regulation of phenylalanine ammonia-lyase in suspension-cultured cells of French bean. *Phytochemistry* 31: 4081-4086.

- Borner, C. (2003) The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol* 39: 615-647.
- Bourque, S., Binet, M.N., Ponchet, M., Pugin, A., & Lebrun-Garcia, A. (1999) Characterization of the cryptogin binding sites on plant plasma membranes. *J Biol Chem* 274: 34699-34705.
- Bourque, S., Ponchet, M., Binet, M.N., Ricci, P., Pugin, A., & Lebrun-Garcia, A. (1998) Comparison of binding properties and early biological effects of elicitors in tobacco cells. *Plant Physiol* 118: 1317-1326.
- Bozhkov, P.V., Filonova, L.H., Suarez, M.F., Helmersson, A., Smertenko, A.P., Zhivotovsky, B., & von Arnold, S. (2004) VEIDase is a principal caspase-like activity involved in plant programmed cell death and essential for embryonic pattern formation. *Cell Death Differ* 11: 175-182.
- Breckenridge, D.G., Germain, M., Mathai, J.P., Nguyen, M., & Shore, G.C. (2003a) Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* 22: 8608-8618.
- Breckenridge, D.G., Stojanovic, M., Marcellus, R.C., & Shore, G.C. (2003b) Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome *c* release to the cytosol. *J Cell Biol* 160: 1115-1127.
- Brookes, P.S., Yoon, Y., Robotham, J.L., Anders, M.W., & Sheu, S.S. (2004) Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: C817-833.
- Buchanan-Wollaston, V., Earl, S., Harrison, E., Mathas, E., Navabpour, S., Page, T., & Pink, D. (2003) The molecular analysis of leaf senescence - a genomics approach. *Plant Biotech J* 1: 3-22.
- Buckner, B., Janick-Buckner, D., Gray, J., & Johal, G.S. (1998) Cell-death mechanisms in maize. *Trends Plant Sci* 3: 218-223.
- Bursch, W., Ellinger, A., Gerner, C., Fröhwein, U., & Schulte-Hermann, R. (2000) Programmed cell death (PCD). Apoptosis, autophagic PCD, or others? *Ann N Y Acad Sci* 926: 1-12.
- Butler, R.D., & Simon, E.W. (1971) Ultrastructural aspects of senescence in plants. *Adv Gerontol Res* 3: 73-129.
- Calderon-Urrea, A., & Dellaporta, S.L. (1999) Cell death and cell protection genes determine the fate of pistils in maize. *Development* 126: 435-441.
- Camello, C., Lomax, R., Petersen, O.H., & Tepikin, A.V. (2002) Calcium leak from intracellular stores - the enigma of calcium signalling. *Cell Calcium* 32: 355-361.
- Campbell, R., & Drew, M.C. (1983) Electron microscopy of gas space (aerenchyma) formation in adventitious roots of *Zea mays* L. subjected to oxygen shortage. *Planta* 157: 350-357.
- Carafoli, E. (2004) Calcium-mediated cellular signals: a story of failures. *Trends Biochem Sci* 29: 371-379.
- Carimi, F., Terzi, M., De Michele, R., Zottini, M., & Lo Schiavo, F. (2004) High levels of the cytokinin BAP induce PCD by accelerating senescence. *Plant Sci* 166: 963-969.
- Carimi, F., Zottini, M., Formentin, E., Terzi, M., & Lo Schiavo, F. (2003) Cytokinins: new apoptotic inducers in plants. *Planta* 216: 413-421.
- Chae, H.J., Ke, N., Kim, H.R., Chen, S., Godzik, A., Dickman, M., & Reed, J.C. (2003) Evolutionarily conserved cytoprotection provided by Bax Inhibitor-1 homologs from animals, plants, and yeast. *Gene* 323: 101-113.

- Chae, H.J., Kim, H.R., Xu, C., Bailly-Maitre, B., Krajewska, M., Krajewski, S., Banares, S., Cui, J., Digicaylioglu, M., Ke, N., Kitada, S., Monosov, E., Thomas, M., Kress, C.L., Babendure, J.R., Tsien, R.Y., Lipton, S.A., & Reed, J.C. (2004) BI-1 regulates an apoptosis pathway linked to endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell* 15: 355-366.
- Chandlee, J.M. (2001) Current molecular understanding of the genetically programmed process of leaf senescence. *Physiol Plant* 113: 1-8.
- Chang, C. (2003) Ethylene signaling: the MAPK module has finally landed. *Trends Plant Sci* 8: 365-368.
- Chang, H.Y., & Yang, X. (2000) Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 821-846.
- Chen, S., & Dickman, M.B. (2004) Bcl-2 family members localize to tobacco chloroplasts and inhibit programmed cell death induced by chloroplast-targeted herbicides. *J Exp Bot* 55: 2617-2623.
- Chen, S., Vaghchhipawala, Z., Li, W., Asard, H., & Dickman, M.B. (2004) Tomato phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits cell death induced by Bax and oxidative stresses in yeast and plants. *Plant Physiol* 135: 1630-1641.
- Cheng, P.C., Gryson, R.I., & Walden, D.B. (1983) Organ initiation and the development of unisexual flowers in the tassel and ear of *Zea mays*. *Am J Bot* 70: 450-462.
- Cheung, A.Y. (1996) The pollen tube pathway: its molecular and biochemical contributions and responses to pollination. *Sex Plant Reprod* 9: 330-336.
- Chiandussi, E., Petrusa, E., Macri, F., & Vianello, A. (2002) Modulation of a plant mitochondrial K<sup>+</sup>-ATP channel and its involvement in cytochrome *c* release. *J Bioenerg Biomembr* 34: 177-184.
- Chichkova, N.V., Kim, S.H., Titova, E.S., Kalkum, M., Morozov, V.S., Rubtsov, Y.P., Kalinina, N.O., Taliansky, M.E., & Vartapetian, A.B. (2004) A plant caspase-like protease activated during the hypersensitive response. *Plant Cell* 16: 157-171.
- Clarke, A., Desikan, R., Hurst, R.D., Hancock, J.T., & Neill, S.J. (2000) NO way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant J* 24: 667-677.
- Clough, S.J., Fengler, K.A., Yu, I.C., Lippok, B., Smith, R.K., Jr., & Bent, A.F. (2000) The *Arabidopsis* *dnd1* "defense, no death" gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 9323-9328.
- Coelho, S.M., Taylor, A.R., Ryan, K.P., Sousa-Pinto, I., Brown, M.T., & Brownlee, C. (2002) Spatiotemporal patterning of reactive oxygen production and Ca<sup>2+</sup> wave propagation in *Fucus* rhizoid cells. *Plant Cell* 14: 2369-2381.
- Coffeen, W.C., & Wolpert, T.J. (2004) Purification and characterization of serine proteases that exhibit caspase-like activity and are associated with programmed cell death in *Avena sativa*. *Plant Cell* 16: 857-873.
- Contento, A.L., Kim, S.J., & Bassham, D.C. (2004) Transcriptome profiling of the response of *Arabidopsis* suspension culture cells to Suc starvation. *Plant Physiol* 135: 2330-2347.
- Creagh, E.M., & Martin, S.J. (2001) Caspases: cellular demolition experts. *Biochem Soc Trans* 29: 696-702.
- Creelman, R.A., & Mullet, J.E. (1997) Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 355-381.
- Curtis, M.J., & Wolpert, T.J. (2002) The oat mitochondrial permeability transition and its implication in victorin binding and induced cell death. *Plant J* 29: 295-312.

- Curtis, M.J., & Wolpert, T.J. (2004) The victorin-induced mitochondrial permeability transition precedes cell shrinkage and biochemical markers of cell death, and shrinkage occurs without loss of membrane integrity. *Plant J* 38: 244-259.
- Dangl, J.L., & Jones, J.D.G. (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411: 826-833.
- Danon, A., Rotari, V.I., Gordon, A., Mailhac, N., & Gallois, P. (2004) Ultraviolet-C overexposure induces programmed cell death in *Arabidopsis*, which is mediated by caspase-like activities and which can be suppressed by caspase inhibitors, p35 and *Defender against Apoptotic Death*. *J Biol Chem* 279: 779-787.
- Darwin, C. 1992 (1859). *L'Origine des espèces (On the origin of species* by means of natural selection or the preservation of favored races in the struggle for life). GF-Flammarion, Paris. 604 pp.
- Dat, J.F., Pellinen, R., Beeckman, T., Van De Cotte, B., Langebartels, C., Kangasjarvi, J., Inze, D., & Van Breusegem, F. (2003) Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco. *Plant J* 33: 621-632.
- De Jong, A.J., Yakimova, E.T., Kapchina, V.M., & Woltering, E.J. (2002) A critical role for ethylene in hydrogen peroxide release during programmed cell death in tomato suspension cells. *Planta* 214: 537-545.
- de Pinto, M.C., Tommasi, F., & De Gara, L. (2002) Changes in the antioxidant systems as part of the signaling pathway responsible for the programmed cell death activated by nitric oxide and reactive oxygen species in tobacco Bright-Yellow 2 cells. *Plant Physiol* 130: 698-708.
- Degterev, A., Boyce, M., & Yuan, J. (2003) A decade of caspases. *Oncogene* 22: 8543-8567.
- del Pozo, O., & Lam, E. (2003) Expression of the baculovirus p35 protein in tobacco affects cell death progression and compromises N-mediated disease resistance response to tobacco mosaic virus. *Mol Plant Microbe Interact* 6: 485-494.
- 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: 13454-13459.
- Demaurex, N., & Distelhorst, C. (2003) Apoptosis - the calcium connection. *Science* 300: 65-67.
- Demura, T., Tashiro, G., Horiguchi, G., Kishimoto, N., Kubo, M., Matsuoka, N., Minami, A., Nagata-Hiwatashi, M., Nakamura, K., Okamura, Y., Sassa, N., Suzuki, S., Yazaki, J., Kikuchi, S., & Fukuda, H. (2002) Visualization by comprehensive microarray analysis of gene expression programs during transdifferentiation of mesophyll cells into xylem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 15794-15799.
- 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: 6957-6962.
- 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: 685-694.
- Distelhorst, C.W., & Shore, G.C. (2004) Bcl-2 and calcium: controversy beneath the surface. *Oncogene* 23: 2875-2880.
- 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: 33105-33114.

- Dong, X. (1998) SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Curr Opin Plant Biol* 1: 316-323.
- Dong, Y.H., Zhan, X.C., Kvarnheden, A., Atkinson, R.G., Morris, B.A., & Gardner, R.C. (1998) Expression of a cDNA from apple encoding a homologue of DAD1, an inhibitor of programmed cell death. *Plant Sci* 139: 165-174.
- Dremina, E.S., Sharov, V.S., Kumar, K., Zaidi, A., Michaelis, E.K., & Schoneich, C. (2004) Anti-apoptotic protein Bcl-2 interacts with and destabilizes the sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA). *Biochem J* 383: 361-370.
- Drew, M.C., He, C.-J., & Morgan, P.W. (2000) Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. *Trends Plant Sci* 5: 123-127.
- Duke, R.C., Ojcius, D.M., & Young, J.D. (1996) Cell suicide in health and disease. *Sci Am* 275: 80-87.
- Eguchi, Y., Shimizu, S., & Tsujimoto, Y. (1997) Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res* 57: 1835-1840.
- Eichmann, R., Schultheiss, H., Kogel, K.H., & Huckelhoven, R. (2004) The barley apoptosis suppressor homologue BAX Inhibitor-1 compromises nonhost penetration resistance of barley to the inappropriate pathogen *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. *Mol Plant Microbe Interact* 17: 484-490.
- Enyedi, A.J., Yalpani, N., Silverman, P., & Raskin, I. (1992) Localization, conjugation, and function of salicylic acid in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 2480-2484.
- Fath, A., Bethke, P., Belligni, V., & Jones, R. (2002) Active oxygen and cell death in cereal aleurone cells. *J Exp Bot* 53: 1273-1282.
- Fath, A., Bethke, P., Lonsdale, J., Meza-Romero, R., & Jones, R. (2000) Programmed cell death in cereal aleurone. *Plant Mol Biol* 44: 255-266.
- Fath, A., Bethke, P.C., Belligni, M.V., Spiegel, Y.N., & Jones, R.L. (2001) Signalling in the cereal aleurone: hormones, reactive oxygen and cell death. *New Phytol* 151: 99-107.
- Fath, A., Bethke, P.C., & Jones, R.L. (1999) Barley aleurone cell death is not apoptotic: characterization of nuclease activities and DNA degradation. *Plant J* 20: 305-315.
- Ferrari, D., Pinton, P., Szabadkai, G., Chami, M., Campanella, M., Pozzan, T., & Rizzuto, R. (2002) Endoplasmic reticulum, Bcl-2 and Ca<sup>2+</sup> handling in apoptosis. *Cell Calcium* 32: 413-420.
- Ferri, K.F., & Kroemer, G. (2001) Mitochondria - the suicide organelles. *Bioessays* 23: 111-115.
- Fleckenstein, A., Janke, J., Doring, H.J., & Leder, O. (1974) Myocardial fiber necrosis due to intracellular Ca<sup>2+</sup> overload - a new principle in cardiac pathophysiology. *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab* 4: 563-580.
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J.H., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M.A., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jones, J.D., Davies, J.M., & Dolan, L. (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422: 442-446.
- 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<sup>2+</sup> concentration within the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 5723-5728.
- Fukuda, H. (2000) Programmed cell death of tracheary elements as a paradigm in plants. *Plant Mol Biol* 44: 245-253.

- Fukuda, H. (2004) Signals that control plant vascular cell differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 379-391.
- Fukuda, H., & Komamine, A. (1980a) Direct evidence for cytodifferentiation to tracheary elements without intervening mitosis in a culture of single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans*. *Plant Physiol* 65: 61-64.
- Fukuda, H., & Komamine, A. (1980b) Establishment of an experimental system for the tracheary elements differentiation from single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans*. *Plant Physiol* 65: 57-60.
- Gallie, D.R., & Young, T.E. (2004) The ethylene biosynthetic and perception machinery is differentially expressed during endosperm and embryo development in maize. *Mol Genet Genomics* 271: 267-281.
- 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: 1325-1331.
- Gietl, C., & Schmid, M. (2001) Ricinosomes: an organelle for developmentally regulated programmed cell death in senescing plant tissues. *Naturwissenschaften* 88: 49-58.
- Giuliani, C., Consonni, G., Gavazzi, G., Colombo, M., & Dolfini, S. (2002) Programmed cell death during embryogenesis in maize. *Ann Bot* 90: 287-292.
- Godbole, A., Varghese, J., Sarin, A., & Mathew, M.K. (2003) VDAC is a conserved element of death pathways in plant and animal systems. *Biochim Biophys Acta* 1642: 87-96.
- Goddard, H., Manison, N.F., Tomos, D., & Brownlee, C. (2000) Elemental propagation of calcium signals in response-specific patterns determined by environmental stimulus strength. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 1932-1937.
- Gomez-Gomez, L. (2004) Plant perception systems for pathogen recognition and defence. *Mol Immunol* 41: 1055-1062.
- Goodman, R.N., & Novacky, A.J. 1994. The hypersensitive reaction in plants to pathogens. APS Press, St-Paul, MN.
- Greenberg, J.T., & Yao, N. (2004) The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell Microbiol* 6: 201-211.
- Grefen, C., & Harter, K. (2004) Plant two-component systems: principles, functions, complexity and cross talk. *Planta* 219: 733-742.
- Groover, A., & Jones, A.M. (1997) Programmed cell death of plant tracheary elements differentiating *in vitro*. *Protoplasma* 196: 197-211.
- Groover, A., & Jones, A.M. (1999) Tracheary element differentiation uses a novel mechanism coordinating programmed cell death and secondary cell wall synthesis. *Plant Physiol* 119: 375-384.
- Gross, A., McDonnell, J.M., & Korsmeyer, S.J. (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13: 1899-1911.
- Grzmil, M., Thelen, P., Hemmerlein, B., Schweyer, S., Voigt, S., Mury, D., & Burfeind, P. (2003) Bax inhibitor-1 is overexpressed in prostate cancer and its specific down-regulation by RNA interference leads to cell death in human prostate carcinoma cells. *Am J Pathol* 163: 543-552.
- Guimarães, C.A., & Linden, R. (2004) Programmed cell death: apoptosis and alternative deathstyles. *Eur J Biochem* 271: 1638-1650.
- Guo, H., & Ecker, J.R. (2004) The ethylene signaling pathway: new insights. *Curr Opin Plant Biol* 7: 40-49.

- 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: 1181-1193.
- Hansen, G. (2000) Evidence for *Agrobacterium*-induced apoptosis in maize cells. *Mol Plant Microbe Interact* 13: 649-657.
- Hatsugai, N., Kuroyanagi, M., Yamada, K., Meshi, T., Tsuda, S., Kondo, M., Nishimura, M., & Hara-Nishimura, I. (2004) A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science* 305: 855-858.
- Heath, M.C. (2000a) Hypersensitive response-related death. *Plant Mol Biol* 44: 321-334.
- Heath, M.C. (2000b) Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr Opin Plant Biol* 3: 315-319.
- Hoeberichts, F.A., Orzaez, D., van der Plas, L.H., & Woltering, E.J. (2001) Changes in gene expression during programmed cell death in tomato cell suspensions. *Plant Mol Biol* 45: 641-654.
- Hoeberichts, F.A., ten Have, A., & Woltering, E.J. (2003) A tomato metacaspase gene is upregulated during programmed cell death in *Botrytis cinerea*-infected leaves. *Planta* 217: 517-522.
- Hoeberichts, F.A., & Woltering, E.J. (2003) Multiple mediators of plant programmed cell death: interplay of conserved cell death mechanisms and plant-specific regulators. *Bioessays* 25: 24-57.
- Huang, X., von Rad, U., & Durner, J. (2002) Nitric oxide induces transcriptional activation of the nitric oxide-tolerant alternative oxidase in *Arabidopsis* suspension cells. *Planta* 215: 914-923.
- Hückelhoven, R. (2004) BAX Inhibitor-1, an ancient cell death suppressor in animals and plants with prokaryotic relatives. *Apoptosis* 9: 299-307.
- Hückelhoven, R., Dechert, C., & Kogel, K.H. (2003) Overexpression of barley BAX Inhibitor 1 induces breakdown of *mlo*-mediated penetration resistance to *Blumeria graminis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 5555-5560.
- 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: 739-748.
- Hutchison, C.E., & Kieber, J.J. (2002) Cytokinin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14 Suppl: S47-59.
- 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: 2468-2474.
- 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: 3201-3211.
- Izyumov, D.S., Avetisyan, A.V., Pletjushkina, O.Y., Sakharov, D.V., Wirtz, K.W., Chernyak, B.V., & Skulachev, V.P. (2004) "Wages of fear": transient threefold decrease in intracellular ATP level imposes apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1658: 141-147.
- Jackowski, G., Jarmolowski, A., & Szweykowska, A. (1987) Kinetin modifies the secondary structure of poly(A) RNA in cucumber cotyledons. *Plant Sci* 52: 67-72.

- Jameson, P.E. 1994. Cytokinin metabolism and compartmentation. *In* Cytokinins: chemistry, activity and function. D.W. Mok & M.C. Mok, editors. CRC Press. 113-128.
- Jean, J.C., Oakes, S.M., & Joyce-Brady, M. (1999) The Bax Inhibitor-1 gene is differentially regulated in adult testis and developing lung by two alternative TATA-less promoters. *Genomics* 57: 201-208.
- Jones, A.M. (2001) Programmed cell death in development and defense. *Plant Physiol* 125: 94-97.
- Jones, A.M., & Dangl, J.L. (1996) Logjam at the Styx: programmed cell death in plants. *Trends Plant Sci* 1: 114-118.
- Jordan, N.D., Franklin, F.C., & Franklin-Tong, V.E. (2000) Evidence for DNA fragmentation triggered in the self-incompatibility response in pollen of *Papaver rhoeas*. *Plant J* 23: 471-479.
- Kao, T.H., & Tsukamoto, T. (2004) The molecular and genetic bases of S-RNase-based self-incompatibility. *Plant Cell* 16 Suppl: S72-83.
- Kaufmann, S.H., & Hengartner, M.O. (2001) Programmed cell death : alive and well in the new millenium. *Trends Cell Biol* 11: 526-534.
- 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: 143-147.
- 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: 12295-12300.
- Kawai-Yamada, M., Ohori, Y., & Uchimiya, H. (2004) Dissection of *Arabidopsis* Bax Inhibitor-1 suppressing Bax-, hydrogen peroxide-, and salicylic acid-induced cell death. *Plant Cell* 16: 21-32.
- 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: 4994-4999.
- Keller, T., Damude, H.G., Werner, D., Doerner, P., Dixon, R.A., & Lamb, C. (1998) A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91<sup>phox</sup> subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca<sup>2+</sup> binding motifs. *Plant Cell* 10: 255-266.
- Kerr, J.F. (2002) History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 181-182: 471-474.
- 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: 239-257.
- Khryanin, V.N. (2002) Role of phytohormones in sex differentiation in plants. *Russian J Plant Physiol* 49: 545-551.
- Kieber, J.J. (1997) The ethylene response pathway in *Arabidopsis*. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 277-296.
- 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: 19406-19415.
- Klee, H.J. (2004) Ethylene signal transduction. Moving beyond *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 135: 660-667.
- Köhler, C., Merkle, T., Roby, D., & Neuhaus, G. (2001) Developmentally regulated expression of a cyclic nucleotide-gated ion channel from *Arabidopsis* indicates its involvement in programmed cell death. *Planta* 213: 327-332.

- Koonin, E.V., & Aravind, L. (2002) Origin and evolution of eukaryotic apoptosis: the bacterial connection. *Cell Death Differ* 9: 394-404.
- Krause, M., & Durner, J. (2004) Harpin inactivates mitochondria in *Arabidopsis* suspension cells. *Mol Plant Microbe Interact* 17: 131-139.
- Ku, S., Yoon, H., Suh, H.S., & Chung, Y.Y. (2003) Male-sterility of thermosensitive genic male-sterile rice is associated with premature programmed cell death of the tapetum. *Planta* 217: 559-565.
- Kunkel, B.N., & Brooks, D.M. (2002) Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr Opin Plant Biol* 5: 325-331.
- Kusnetsov, V.V., Oelmüller, R., Sarwat, M.I., Porfirora, S.A., Cherepneva, G.N., Herrmann, R.G., & Kulaeva, O.N. (1994) Cytokinins, abscisic acid and light affect accumulation of chloroplast proteins in *Lupinus luteus* cotyledons without notable effect on steady-state mRNA levels - Specific protein response to light/phytohormone interaction. *Planta* 194: 318-327.
- Lacomme, C., & Roby, D. (1999) Identification of new early markers of the hypersensitive response in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 459: 149-153.
- 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: 7956-7961.
- Laloi, C., Apel, K., & Danon, A. (2004) Reactive oxygen signalling: the latest news. *Curr Opin Plant Biol* 7: 323-328.
- Laloi, C., Rayapuram, N., Chartier, Y., Grienenberger, J.M., Bonnard, G., & Meyer, Y. (2001) Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 14144-14149.
- Lam, E. (2004) Controlled cell death, plant survival and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 305-315.
- Lam, E., & del Pozo, O. (2000) Caspase-like protease involvement in the control of plant cell death. *Plant Mol Biol* 44: 417-428.
- Lam, E., Kato, N., & Lawton, M. (2001) Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 411: 848-853.
- Lam, E., Pontier, D., & del Pozo, O. (1999) Die and let live - programmed cell death in plants. *Curr Opin Plant Biol* 2: 502-507.
- Lamotte, O., Gould, K., Lecourieux, D., Sequeira-Legrand, A., Lebrun-Garcia, A., Durner, J., Pugin, A., & Wendehenne, D. (2004) Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein. *Plant Physiol* 135: 516-529.
- Lebrun-Garcia, A., Ouaked, F., Chiltz, A., & Pugin, A. (1998) Activation of MAPK homologues by elicitors in tobacco cells. *Plant J* 15: 773-781.
- Lecourieux, D., Mazars, C., Pauly, N., Ranjeva, R., & Pugin, A. (2002) Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Plant Cell* 14: 2627-2641.
- Lecourieux-Ouaked, F., Pugin, A., & Lebrun-Garcia, A. (2000) Phosphoproteins involved in the signal transduction of cryptogein, an elicitor of defense reactions in tobacco. *Mol Plant Microbe Interact* 13: 821-829.
- Lee, J.H., Kim, D.-M., Lim, Y.P., & Pai, H.-S. (2004) The shooty callus induced by suppression of tobacco CHRK1 receptor-like kinase is a phenocopy of the tobacco genetic tumor. *Plant Cell Rep* 23: 397-403.
- Lee, R.-H., & Chen, S.-C.G. (2002) Programmed cell death during rice leaf senescence is nonapoptotic. *New Phytol* 155: 25-32.

- Leist, M., Single, B., Castoldi, A.F., Kuhnle, S., & Nicotera, P. (1997) Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 185: 1481-1486.
- Leng, Q., Mercier, R.W., Yao, W., & Berkowitz, G.A. (1999) Cloning and first functional characterization of a plant cyclic nucleotide-gated cation channel. *Plant Physiol* 121: 753-761.
- Leopold, A.C. (1961) Senescence in plant development : the death of plants or plant parts may be of positive ecological or physiological value. *Science* 134: 1727-1732.
- Lepiniec, L., Babiychuk, E., Kushnir, S., Van Montagu, M., & Inze, D. (1995) Characterization of an *Arabidopsis thaliana* cDNA homologue to animal poly(ADP-ribose) polymerase. *FEBS Lett* 364: 103-108.
- Levine, A., Pennell, R.I., Alvarez, M.E., Palmer, R., & Lamb, C. (1996) Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Curr Biol* 6: 427-437.
- Li, J., Wang, D.Y., Li, Q., Xu, Y.J., Cui, K.M., & Zhu, Y.X. (2004) PPF1 inhibits programmed cell death in apical meristems of both G2 pea and transgenic *Arabidopsis* plants possibly by delaying cytosolic Ca<sup>2+</sup> elevation. *Cell Calcium* 35: 71-77.
- Li, W., & Dickman, M.B. (2004) Abiotic stress induces apoptotic-like features in tobacco that is inhibited by expression of human Bcl-2. *Biotechnol Lett* 26: 87-95.
- Lincoln, J.E., Richael, C., Overduin, B., Smith, K., Bostock, R., & Gilchrist, D.G. (2002) Expression of the antiapoptotic baculovirus p35 gene in tomato blocks programmed cell death and provides broad-spectrum resistance to disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 15217-15221.
- Lindholm, P., Kuittinen, T., Sorri, O., Guo, D., Merits, A., Tormakangas, K., & Runeberg-Roos, P. (2000) Glycosylation of phytepsin and expression of *dad1*, *dad2* and *ost1* during onset of cell death in germinating barley scutella. *Mech Dev* 93: 169-173.
- Lockshin, R.A. 1969. Lysosomes in insects. In Lysosomes in biology and pathology. J.T. Dingle & H.B. Fell, editors. North Holland Publishing, Amsterdam. 363-391.
- Lockshin, R.A., & Williams, C.M. (1965a) Programmed cell death : I. Cytology of the degeneration of the intersegmental muscles of the Pernyi silkmoth. *J Insect Physiol* 11: 123-133.
- Lockshin, R.A., & Williams, C.M. (1965b) Programmed cell death : II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmoths. *J Insect Physiol* 10: 643-649.
- 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: 831-844.
- Lockshin, R.A., & Zakeri, Z. (2002) Caspase-independent cell deaths. *Curr Opin Cell Biol* 14: 727-733.
- Lockshin, R.A., & Zakeri, Z. (2004) Apoptosis, autophagy, and more. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 2405-2419.
- Logan, D.C., & Knight, M.R. (2003) Mitochondrial and cytosolic calcium dynamics are differentially regulated in plants. *Plant Physiol* 133: 21-24.
- Lord, E. (2000) Adhesion and cell movement during pollination: cherchez la femme. *Trends Plant Sci* 5: 368-373.
- Lorrain, S., Vaillau, F., Balagué, C., & Roby, D. (2003) Lesion mimic mutants: keys for deciphering cell death and defense pathways in plants? *Trends Plant Sci* 8: 263-271.

- Ma, T.S., Mann, D.L., Lee, J.H., & Gallinghouse, G.J. (1999) SR compartment calcium and cell apoptosis in SERCA overexpression. *Cell Calcium* 26: 25-36.
- 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: 911-917.
- Makishima, T., Nakashima, T., Nagata-Kuno, K., Fukushima, K., Iida, H., Sakaguchi, M., Ikehara, Y., Komiyama, S., & Nishimoto, T. (1997) The highly conserved DAD1 protein involved in apoptosis is required for N-linked glycosylation. *Genes Cells* 2: 129-141.
- Martineau, B., Houck, C.M., Sheehy, R.E., & Hiatt, W.R. (1994) Fruit-specific expression of the *A. tumefaciens* isopentenyl transferase gene in tomato: effects on fruit ripening and defense-related gene expression in leaves. *Plant J* 5: 11-19.
- Matsumura, H., Nirasawa, S., Kiba, A., Urasaki, N., Saitoh, H., Ito, M., Kawai-Yamada, M., Uchimiyama, H., & Terauchi, R. (2003) Overexpression of Bax inhibitor suppresses the fungal elicitor-induced cell death in rice (*Oryza sativa* L.) cells. *Plant J* 33: 425-434.
- Maxwell, D.P., Nickels, R., & McIntosh, L. (2002) Evidence of mitochondrial involvement in the transduction of signals required for the induction of genes associated with pathogen attack and senescence. *Plant J* 29: 269-279.
- McCabe, M.S., Garratt, L.C., Schepers, F., Jordi, W.J., Stopen, G.M., Davelaar, E., van Rhijn, J.H., Power, J.B., & Davey, M.R. (2001) Effects of P<sub>SAG12</sub>-IPT gene expression on development and senescence in transgenic lettuce. *Plant Physiol* 127: 505-516.
- McCabe, P.F., & Leaver, C.J. (2000) Programmed cell death in cell cultures. *Plant Mol Biol* 44: 359-368.
- McClure, B. (2004) Pillow talk in plants. *Nature* 429: 249-250.
- McDowell, J.M., & Dangl, J.L. (2000) Signal transduction in the plant immune response. *Trends Biochem Sci* 25: 79-82.
- Melino, G. (2002) The meaning of death. *Cell Death Differ* 9: 347-348.
- Memelink, J., Hoge, J.H.C., & Schilperoort, R.A. (1987) Cytokinin stress changes the developmental regulation of several defence-related genes in tobacco. *EMBO J* 6: 3579-3583.
- Memelink, J., Linthorst, H.J., Schilperoort, R.A., & Hoge, J.H. (1990) Tobacco genes encoding acidic and basic isoforms of pathogenesis-related proteins display different expression patterns. *Plant Mol Biol* 14: 119-126.
- Mithöfer, A., & Mazars, C. (2002) Aequorin-based measurements of intracellular Ca<sup>2+</sup>-signatures in plant cells. *Biol Proced Online* 4: 105-118.
- Mitsuhara, I., Malik, K.A., Miura, M., & Ohashi, Y. (1999) Animal cell-death suppressors Bcl-X<sub>L</sub> and Ced-9 inhibit cell death in tobacco plants. *Curr Biol* 9: 775-778.
- Mittler, R., Simon, L., & Lam, E. (1997) Pathogen-induced programmed cell death in tobacco. *J Cell Sci* 110 ( Pt 11): 1333-1344.
- Mlejnek, P., Doležel, P., & Procházka, S. (2003) Intracellular phosphorylation of benzyladenosine is related to apoptosis induction in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Environ* 26: 1723-1735.
- Mlejnek, P., & Procházka, S. (2002) Activation of caspase-like proteases and induction of apoptosis by isopentenyladenosine in tobacco BY-2 cells. *Planta* 215: 158-166.
- Mok, D.W., & Mok, M.C. (2001) Cytokinin metabolism and action. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 89-118.

- Mok, M.C. 1994. Cytokinins and plant development: an overview. *In* Cytokinins: chemistry, activity and function. D.W. Mok & M.C. Mok, editors. CRC Press. 155-166.
- Moon, H., Lee, B., Choi, G., Shin, D., Prasad, D.T., Lee, O., Kwak, S.S., Kim, D.H., Nam, J., Bahk, J., Hong, J.C., Lee, S.Y., Cho, M.J., Lim, C.O., & Yun, D.J. (2003) NDP kinase 2 interacts with two oxidative stress-activated MAPKs to regulate cellular redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 358-363.
- Moriyasu, Y., & Ohsumi, Y. (1996) Autophagy in tobacco suspension-cultured cells in response to sucrose starvation. *Plant Physiol* 111: 1233-1241.
- Murphy, A.M., Chivasa, S., Singh, D.P., & Carr, J.P. (1999) Salicylic acid-induced resistance to viruses and other pathogens: a parting of the ways? *Trends Plant Sci* 4: 155-160.
- Nakamura, K., Bossy-Wetzel, 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: 731-740.
- Napier, R. (2004) Plant hormone binding sites. *Ann Bot* 93: 227-233.
- Neill, S.J., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R.D., & Hancock, J.T. (2002) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J Exp Bot* 53: 1237-1247.
- Neill, S.J., Desikan, R., & Hancock, J.T. (2003) Nitric oxide signalling in plants. *New Phytol* 159: 11-35.
- Ng, C.K., & McAinsh, M.R. (2003) Encoding specificity in plant calcium signalling : hot-spotting the ups and downs and waves. *Ann Bot* 92: 477-485.
- Noodén, L.D., Guiamét, J.J., & John, I. (1997) Senescence mechanisms. *Physiol Plant* 101: 746-753.
- Norman, C., Howell, K.A., Millar, A.H., Whelan, J.M., & Day, D.A. (2004) Salicylic acid is an uncoupler and inhibitor of mitochondrial electron transport. *Plant Physiol* 134: 492-501.
- 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  $Ca^{2+}$  mobilization promotes cytochrome *c* release during apoptosis. *J Biol Chem* 277: 20301-20308.
- 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: 9219-9225.
- Oakes, S.A., Scorrano, L., Opferman, J.T., Bassik, M.C., Nishino, M., Pozzan, T., & Korsmeyer, S.J. (2005) Proapoptotic BAX and BAK regulate the type 1 inositol trisphosphate receptor and calcium leak from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 105-110.
- Obara, K., Kuriyama, H., & Fukuda, H. (2001) Direct evidence of active and rapid nuclear degradation triggered by vacuole rupture during programmed cell death in *Zinnia*. *Plant Physiol* 125: 615-626.
- Ohya, T., & Suzuki, H. (1988) Cytokinin-promoted polyribosome formation in excised cucumber cotyledons. *J Plant Physiol*. 133: 295.
- Ordog, S.H., Higgins, V.J., & Vanlerberghe, G.C. (2002) Mitochondrial alternative oxidase is not a critical component of plant viral resistance but may play a role in the hypersensitive response. *Plant Physiol* 129: 1858-1865.

- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., & Nicotera, P. (2003) Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 552-565.
- Orzaez, D., & Granell, A. (1997) DNA fragmentation is regulated by ethylene during carpel senescence. *Plant J* 11: 137-144.
- Ouellet, M. 2004. 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*. In Biochimie et Microbiologie. Université Laval, Québec. 130 pp.
- Overmyer, K., Brosche, M., & Kangasjarvi, J. (2003) Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends Plant Sci* 8: 335-342.
- Pasqualini, S., Piccioni, C., Reale, L., Ederli, L., Della Torre, G., & Ferranti, F. (2003) Ozone-induced cell death in tobacco cultivar Bel W3 plants. The role of programmed cell death in lesion formation. *Plant Physiol* 133: 1122-1134.
- Pauly, N., Knight, M.R., Thuleau, P., Graziana, A., Muto, S., Ranjeva, R., & Mazars, C. (2001) The nucleus together with the cytosol generates patterns of specific cellular calcium signatures in tobacco suspension culture cells. *Cell Calcium* 30: 413-421.
- Pauly, N., Knight, M.R., Thuleau, P., van der Luit, A.H., Moreau, M., Trewavas, A.J., Ranjeva, R., & Mazars, C. (2000) Control of free calcium in plant cell nuclei. *Nature* 405: 754-755.
- Pennell, R.I., & Lamb, C. (1997) Programmed cell death in plants. *Plant Cell* 9: 1157-1168.
- Petros, A.M., Olejniczak, E.T., & Fesik, S.W. (2004) Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta* 1644: 83-94.
- 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: 857-862.
- Polverari, A., Molesini, B., Pezzotti, M., Buonauro, R., Marte, M., & Delledonne, M. (2003) Nitric oxide-mediated transcriptional changes in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact* 16: 1094-1105.
- Poupet, A., Cardin, L., Bettachini, B., & Beck, D. (1990) Accumulation de protéines solubles (PR1a protéine) dans des bourgeons de *Nicotiana tabacum* cultivés *in vitro* en présence d'une cytokinine. *C. R. Acad. Sci. Paris* 311: 239-246.
- Pugin, A., Frachisse, J.M., Tavernier, E., Bigny, R., Gout, E., Douce, R., & Guern, J. (1997) Early events induced by the elicitor cryptogein in tobacco cells: involvement of a plasma membrane NADPH oxidase and activation of glycolysis and the pentose phosphate pathway. *Plant Cell* 9: 2077-2091.
- 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-X<sub>L</sub> 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: 278-282.
- Rakwal, R., Kumar Agrawal, G., Tamogami, S., Yonekura, M., Prasad Agrawal, B., & Iwahashi, H. (2003) Novel insight into kinetin-inducible stress responses in rice seedlings. *Plant Physiol Biochem* 41: 453-457.
- Rao, M.V., Koch, J.R., & Davis, K.R. (2000) Ozone: a tool for probing programmed cell death in plants. *Plant Mol Biol* 44: 345-358.

- Rashotte, A.M., Carson, S.D., To, J.P., & Kieber, J.J. (2003) Expression profiling of cytokinin action in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 132: 1998-2011.
- Raskin, I., Ehman, A., Melander, W.R., & Meusse, B.D.J. (1987) Salicylic acid: a natural inducer of heat production in *Arum* lilies. *Science* 237: 1601-1602.
- Raskin, I., Turner, I.M., & Melander, W.R. (1989) Regulation of heat production in the inflorescences of an *Arum* lily by endogenous salicylic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 2214-2218.
- Raven, P.H., Evert, R.F., & Eichhorn, S.E. 1999. Biology of Plants. Sixth Edition. W.H. Freeman and Company Worth Publishers, New-York. 944 pp.
- Reddy, A.S. (2001) Calcium: silver bullet in signaling. *Plant Sci* 160: 381-404.
- Rhoads, D.M., & McIntosh, L. (1993) The salicylic acid-inducible alternative oxidase gene *aox1* and genes encoding pathogenesis-related proteins share regions of sequence similarity in their promoters. *Plant Mol Biol* 21: 615-624.
- Rizzuto, R., Pinton, P., Ferrari, D., Chami, M., Szabadkai, G., Magalhães, P.J., Di Virgilio, F., & Pozzan, T. (2003) Calcium and apoptosis: facts and hypotheses. *Oncogene* 22: 8619-8627.
- Roberts, K., & McCann, M.C. (2000) Xylogenesis: the birth of a corpse. *Curr Opin Plant Biol* 3: 517-522.
- Robson, C.A., & Vanlerberghe, G.C. (2002) Transgenic plant cells lacking mitochondrial alternative oxidase have increased susceptibility to mitochondria-dependent and -independent pathways of programmed cell death. *Plant Physiol* 129: 1908-1920.
- Roebuck, P., Sexton, R., & Mansfield, J.W. (1978) Ultrastructural observations on the development of the hypersensitive reaction in leaves of *Phaseolus vulgaris* cv. Red Mexican inoculated with *Pseudomonas phaseolicola* (race 1). *Physiol Plant Pathol* 12: 151-157.
- Romanov, G.A. (2002) The phytohormone receptors. *Russian J Plant Physiol* 49: 552-560.
- Roos, W. (2000) Ion mapping in plant cells - methods and applications in signal transduction research. *Planta* 210: 347-370.
- Rubinstein, B. (2000) Regulation of cell death in flower petals. *Plant Mol Biol* 44: 303-318.
- Rudd, J.J., & Franklin-Tong, V.E. (2001) Unravelling response-specificity in  $Ca^{2+}$  signalling pathways in plant cells. *New Phytol* 151: 7-33.
- Rudd, J.J., & Franklin-Tong, V.E. (2003) Signals and targets of the self-incompatibility response in pollen of *Papaver rhoeas*. *J Exp Bot* 54: 141-148.
- 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: 4161-4172.
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.-Y., & Hunt, M.D. (1996) Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8: 1809-1819.
- Ryerson, D.E., & Heath, M.C. (1996) Cleavage of nuclear DNA into oligonucleosomal fragments during cell death induced by fungal infection or by abiotic treatments. *Plant Cell* 8: 393-402.
- Saelens, X., Festjens, N., Walle, L.V., van Gurp, M., van Loo, G., & Vandenabeele, P. (2004) Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23: 2861-2874.
- Salvesen, G.S., & Dixit, V.M. (1999) Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 10964-10967.

- 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: 393-399.
- Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C., & Harper, J.F. (2002) Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell* 14 Suppl: S401-417.
- Saviani, E.E., Orsi, C.H., Oliveira, J.F., Pinto-Maglio, C.A., & Salgado, I. (2002) Participation of the mitochondrial permeability transition pore in nitric oxide-induced plant cell death. *FEBS Lett* 510: 136-140.
- Schenk, P.M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J.P., Richmond, T., Somerville, S.C., & Manners, J.M. (2000) Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 11655-11660.
- Schmits, R., Cochlovius, B., Treitz, G., Regitz, E., Ketter, R., Preuss, K.D., Romeike, B.F., & Pfreundschuh, M. (2002) Analysis of the antibody repertoire of astrocytoma patients against antigens expressed by gliomas. *Int J Cancer* 98: 73-77.
- Schweichel, J.U., & Merker, H.J. (1973) The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 7: 253-266.
- 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: 135-139.
- Scrase-Field, S.A.M.G., & Knight, H. (2003) Calcium : just a chemical switch? *Curr Opin Plant Biol* 6: 500-506.
- Seo, H.S., Song, J.T., Cheong, J.J., Lee, Y.H., Lee, Y.W., Hwang, I., Lee, J.S., & Choi, Y.D. (2001) Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 4788-4793.
- Sharpe, J.C., Arnoult, D., & Youle, R.J. (2004) Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members. *Biochim Biophys Acta* 1644: 107-113.
- Sherameti, I., Shahollari, B., Landsberger, M., Westermann, M., Cherepneva, G., Kusnetsov, V., & Oelmüller, R. (2004) Cytokinin stimulates polyribosome loading of nuclear-encoded mRNAs for the plastid ATP synthase in etioplasts of *Lupinus luteus*: the complex accumulates in the inner-envelope membrane with the CF<sub>1</sub> moiety located towards the stromal space. *Plant J* 38: 578-593.
- Shirasu, K., & Schulze-Lefert, P. (2000) Regulators of cell death in disease resistance. *Plant Mol Biol* 44: 371-385.
- Siedow, J.N., & Umbach, A.L. (1995) Plant mitochondrial electron transfer and molecular biology. *Plant Cell* 7: 821-831.
- Sloviter, R.S. (2002) Apoptosis: a guide for the perplexed. *Trends Pharmacol Sci* 23: 19-24.
- Snedden, W.A., & Fromm, H. (2001) Calmodulin as a versatile calcium signal transducer in plants. *New Phytol* 151: 35-66.
- Sprick, M.R., & Walczak, H. (2004) The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1644: 125-132.
- Stein, J.C., & Hansen, G. (1999) Mannose induces an endonuclease responsible for DNA laddering in plant cells. *Plant Physiol* 121: 71-80.
- 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: 8661-8665.

- Suarez, M.F., Filonova, L.H., Smertenko, A., Savenkov, E.I., Clapham, D.H., von Arnold, S., Zhivotovsky, B., & Bozhkov, P.V. (2004) Metacaspase-dependent programmed cell death is essential for plant embryogenesis. *Curr Biol* 14: R339-340.
- Sugimoto, A., Hozak, R.R., Nakashima, T., Nishimoto, T., & Rothman, J.H. (1995) Dad-1, an endogenous programmed cell death suppressor in *Caenorhabditis elegans* and vertebrates. *Embo J* 14: 4434-4441.
- Sugiyama, M., Ito, J., Aoyagi, S., & Fukuda, H. (2000) Endonucleases. *Plant Mol Biol* 44: 387-397.
- Sun, Y.L., Zhao, Y., Hong, X., & Zhai, Z.H. (1999) Cytochrome *c* release and caspase activation during menadione-induced apoptosis in plants. *FEBS Lett* 462: 317-321.
- Swidzinski, J.A., Leaver, C.J., & Sweetlove, L.J. (2004) A proteomic analysis of plant programmed cell death. *Phytochemistry* 65: 1829-1838.
- Swidzinski, J.A., Sweetlove, L.J., & Leaver, C.J. (2002) A custom microarray analysis of gene expression during programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 30: 431-446.
- Szabadkai, G., & Rizzuto, R. (2004) Participation of endoplasmic reticulum and mitochondrial calcium handling in apoptosis: more than just neighborhood? *FEBS Lett* 567: 111-115.
- 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: 144-150.
- Tada, Y., Hata, S., Takata, Y., Nakayashiki, H., Tosa, Y., & Mayama, S. (2001) Induction and signaling of an apoptotic response typified by DNA laddering in the defense response of oats to infection and elicitors. *Mol Plant Microbe Interact* 14: 477-486.
- Takayama, S., Cazals-Hatem, D.L., Kitada, S., Tanaka, S., Miyashita, T., Hovey, L.R., 3rd, Huen, D., Rickinson, A., Veerapandian, P., Krajewski, S., & et al. (1994) Evolutionary conservation of function among mammalian, avian, and viral homologs of the Bcl-2 oncoprotein. *DNA Cell Biol* 13: 679-692.
- Tanurdzic, M., & Banks, J.A. (2004) Sex-determining mechanisms in land plants. *Plant Cell* 16 Suppl: S61-71.
- Tavernier, E., Wendehenne, D., Blein, J.P., & Pugin, A. (1995) Involvement of free calcium in action of cryptogin, a proteinaceous elicitor of hypersensitive reaction in tobacco cells. *Plant Physiol* 109: 1025-1031.
- Than, M.E., Helm, M., Simpson, D.J., Lottspeich, F., Huber, R., & Gietl, C. (2004) The 2.0 Å crystal structure and substrate specificity of the KDEL-tailed cysteine endopeptidase functioning in programmed cell death of *Ricinus communis* endosperm. *J Mol Biol* 336: 1103-1116.
- Thomas, S.G., & Franklin-Tong, V.E. (2004) Self-incompatibility triggers programmed cell death in *Papaver* pollen. *Nature* 429: 305-309.
- Tian, R., Zhang, G.Y., Yan, C.H., & Dai, Y.R. (2000) Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase and activation of caspase-3-like protease in heat shock-induced apoptosis in tobacco suspension cells. *FEBS Lett* 474: 11-15.
- 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: 1271-1281.
- 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: 961-967.
- Van der Biezen, E.A., & Jones, J.D. (1998) The NB-ARC domain: a novel signalling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. *Curr Biol* 8: R226-R227.
- van der Hoorn, R.A., & Jones, J.D. (2004) The plant proteolytic machinery and its role in defence. *Curr Opin Plant Biol* 7: 400-407.
- van der Kop, D.A.M., Ruys, G., Dees, D., van der Schoot, C., Douwe de Boer, A., & van Doorn, W.G. (2003) Expression of *defender against apoptotic death (DAD-1)* in *Iris* and *Dianthus* petals. *Physiol Plant* 117: 256-263.
- van Doorn, W.G., & Woltering, E.J. (2004) Senescence and programmed cell death: substance or semantics? *J Exp Bot* 55: 2147-2153.
- van 't Veer, L.J., Dai, H., van de Vijver, M.J., He, Y.D., Hart, A.A., Mao, M., Peterse, H.L., van der Kooy, K., Marton, M.J., Witteveen, A.T., Schreiber, G.J., Kerkhoven, R.M., Roberts, C., Linsley, P.S., Bernards, R., & Friend, S.H. (2002) Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415: 530-536.
- Vanden Abeele, F., Skryma, R., Shuba, Y., Van Coppenolle, F., Slomianny, C., Roudbaraki, M., Mauroy, B., Wuytack, F., & Prevarskaya, N. (2002) Bcl-2-dependent modulation of Ca<sup>2+</sup> homeostasis and store-operated channels in prostate cancer cells. *Cancer Cell* 1: 169-179.
- Vanlerberghe, G.C., Robson, C.A., & Yip, J.Y. (2002) Induction of mitochondrial alternative oxidase in response to a cell signal pathway down-regulating the cytochrome pathway prevents programmed cell death. *Plant Physiol* 129: 1829-1842.
- Vaux, D.L. (2002) Apoptosis timeline. *Cell Death Differ* 9: 349-354.
- 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: 440-442.
- Vaux, D.L., Weissman, I.L., & Kim, S.K. (1992) Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science* 258: 1955-1957.
- Vercammen, D., van de Cotte, B., De Jaeger, G., Eeckhout, D., Casteels, P., Vandepoele, K., Vandenberghe, I., Van Beeumen, J., Inze, D., & Van Breusegem, F. (2004) Type II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of *Arabidopsis thaliana* cleave substrates after arginine and lysine. *J Biol Chem* 279: 45329-45336.
- Villalva, C., Trempat, P., Greenland, C., Thomas, C., Girard, J.P., Moebius, F., Delsol, G., & Brousset, P. (2002) Isolation of differentially expressed genes in NPM-ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Br J Haematol* 118: 791-798.
- Virolainen, E., Blokhina, O., & Fagerstedt, K. (2002) Ca<sup>2+</sup>-induced high amplitude swelling and cytochrome *c* release from wheat (*Triticum aestivum* L.) mitochondria under anoxic stress. *Ann Bot* 90: 509-516.
- Volotovski, I.D., Sokolovsky, S.G., Molchan, O.V., & Knight, M.R. (1998) Second messengers mediate increases in cytosolic calcium in tobacco protoplasts. *Plant Physiol* 117: 1023-1030.
- Wajant, H. (2002) The Fas signaling pathway : more than a paradigm. *Science* 296: 1635-1636.
- Walter, L., Dirks, B., Rothermel, E., Heyens, M., Szpirer, C., Levan, G., & Gunther, E. (1994) A novel, conserved gene of the rat that is developmentally regulated in the testis. *Mamm Genome* 5: 216-221.

- Walter, L., Marynen, P., Szpirer, J., Levan, G., & Gunther, E. (1995) Identification of a novel conserved human gene, TEGT. *Genomics* 28: 301-304.
- Wang, D., Xu, Y., Li, Q., Hao, X., Cui, K., Sun, F., & Zhu, Y. (2003) Transgenic expression of a putative calcium transporter affects the time of *Arabidopsis* flowering. *Plant J* 33: 285-292.
- Wang, H., Li, J., Bostock, R.M., & Gilchrist, D.G. (1996a) Apoptosis : a functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development. *Plant Cell* 8: 375-391.
- Wang, H., Wu, H.M., & Cheung, A.Y. (1996b) Pollination induces mRNA poly(A) tail-shortening and cell deterioration in flower transmitting tissue. *Plant J* 9: 715-727.
- Wang, K.L., Li, H., & Ecker, J.R. (2002) Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell* 14 Suppl: S131-151.
- Wang, M., Oppedijk, B.J., Lu, X., Van Duijn, B., & Schilperoort, R.A. (1996c) Apoptosis in barley aleurone during germination and its inhibition by abscisic acid. *Plant Mol Biol* 32: 1125-1134.
- Wang, S., & El-Deiry, W.S. (2003) TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene* 22: 8628-8633.
- Watanabe, N., & Lam, E. (2004) Recent advance in the study of caspase-like proteases and Bax inhibitor-1 in plants: their possible roles as regulator of programmed cell death. *Mol Plant Pathol* 5: 65-70.
- Welsh, J.B., Sapinoso, L.M., Su, A.I., Kern, S.G., Wang-Rodriguez, J., Moskaluk, C.A., Frierson, H.F., Jr., & Hampton, G.M. (2001) Analysis of gene expression identifies candidate markers and pharmacological targets in prostate cancer. *Cancer Res* 61: 5974-5978.
- Wendehenne, D., Binet, M.N., Blein, J.P., Ricci, P., & Pugin, A. (1995) Evidence for specific, high-affinity binding sites for a proteinaceous elicitor in tobacco plasma membrane. *FEBS Lett* 374: 203-207.
- Wendehenne, D., Durner, J., & Klessig, D.F. (2004) Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Curr Opin Plant Biol* 7: 449-455.
- Wendehenne, D., Lamotte, O., Frachisse, J.M., Barbier-Brygoo, H., & Pugin, A. (2002) Nitrate efflux is an essential component of the cryptogein signaling pathway leading to defense responses and hypersensitive cell death in tobacco. *Plant Cell* 14: 1937-1951.
- Werner, T., Motyka, V., Laucou, V., Smets, R., Van Onckelen, H., & Schmülling, T. (2003) Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell* 15: 2532-2550.
- White, P.J., & Broadley, M.R. (2003) Calcium in plants. *Ann Bot* 92: 487-511.
- Wu, H., & Cheung, A.Y. (2000) Programmed cell death in plant reproduction. *Plant Mol Biol* 44: 267-281.
- Xie, Z., & Chen, Z. (1999) Salicylic acid induces rapid inhibition of mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation in tobacco cells. *Plant Physiol* 120: 217-226.
- Xie, Z., & Chen, Z. (2000) Harpin-induced hypersensitive cell death is associated with altered mitochondrial functions in tobacco cells. *Mol Plant Microbe Interact* 13: 183-190.

- Xu, P., Blancaflor, E.B., & Roossinck, M.J. (2003) In spite of induced multiple defense responses, tomato plants infected with *Cucumber mosaic virus* and D satellite RNA succumb to systemic necrosis. *Mol Plant Microbe Interact* 16: 467-476.
- Xu, Q., & Reed, J.C. (1998) Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast. *Mol Cell* 1: 337-346.
- Xu, Y., & Hanson, M.R. (2000) Programmed cell death during pollination-induced petal senescence in *Petunia*. *Plant Physiol* 122: 1323-1333.
- Yamada, T., Takatsu, Y., Manabe, T., Kasumi, M., & Marubashi, W. (2003) Suppressive effect of trehalose on apoptotic cell death leading to petal senescence in ethylene-insensitive flowers of gladiolus. *Plant Sci* 164: 213-221.
- Yang, H.-M., Zhang, X.-Y., & Wang, G.-X. (2004) Cytosolic calcium oscillation signaling in guard cell. *Plant Sci* 166: 549-556.
- Yao, N., Eisfelder, B.J., Marvin, J., & Greenberg, J.T. (2004) The mitochondrion - an organelle commonly involved in programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 40: 596-610.
- Yao, N., Tada, Y., Sakamoto, M., Nakayashiki, H., Park, P., Tosa, Y., & Mayama, S. (2002) Mitochondrial oxidative burst involved in apoptotic response in oats. *Plant J* 30: 567-579.
- Yen, C.-H., & Yang, C.-H. (1998) Evidence for programmed cell death during leaf senescence in plants. *Plant Cell Physiol* 39: 922-927.
- Yoshida, S. (2003) Molecular regulation of leaf senescence. *Curr Opin Plant Biol* 6: 79-84.
- Yoshida, Y. (1961) The nuclear control of chloroplast activity in *Elodea* leaf cells. *Protoplasma* 54: 476-492.
- Yoshimori, T. (2004) Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells. *Biochem Biophys Res Commun* 313: 453-458.
- Yoshimoto, K., Hanaoka, H., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Noda, T., & Ohsumi, Y. (2004) Processing of ATG8s, ubiquitin-like proteins, and their deconjugation by ATG4s are essential for plant autophagy. *Plant Cell* 16: 2967-2983.
- Young, T.E., & Gallie, D.R. (2000) Programmed cell death during endosperm development. *Plant Mol Biol* 44: 283-301.
- Young, T.E., Giesler-Lee, J., & Gallie, D.R. (2004a) Senescence-induced expression of cytokinin reverses pistil abortion during maize flower development. *Plant J* 38: 910-922.
- Young, T.E., Meeley, R.B., & Gallie, D.R. (2004b) ACC synthase expression regulates leaf performance and drought tolerance in maize. *Plant J* 40: 813-825.
- Yu, X.H., Perdue, T.D., Heimer, Y.M., & Jones, A.M. (2002) Mitochondrial involvement in tracheary element programmed cell death. *Cell Death Differ* 9: 189-198.
- Zha, H., Fisk, H.A., Yaffe, M.P., Mahajan, N., Herman, B., & Reed, J.C. (1996) Structure-function comparisons of the proapoptotic protein Bax in yeast and mammalian cells. *Mol Cell Biol* 16: 6494-6508.
- Zhang, C., Czymmek, K.J., & Shapiro, A.D. (2003) Nitric oxide does not trigger early programmed cell death events but may contribute to cell-to-cell signaling governing progression of the *Arabidopsis* hypersensitive response. *Mol Plant Microbe Interact* 16: 962-972.
- Zhang, S., Liu, Y., & Klessig, D.F. (2000) Multiple levels of tobacco WIPK activation during the induction of cell death by fungal elicitors. *Plant J* 23: 339-347.
- Zuppini, A., Navazio, L., & Mariani, P. (2004) Endoplasmic reticulum stress-induced programmed cell death in soybean cells. *J Cell Sci* 117: 2591-2598.