



IMSBP, une protéine identifiée comme une cible de la S100B, impliquée dans la distribution subcellulaire des mitochondries.

Arnaud Hubstenberger

► To cite this version:

Arnaud Hubstenberger. IMSBP, une protéine identifiée comme une cible de la S100B, impliquée dans la distribution subcellulaire des mitochondries.. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2006. Français. <tel-00175259>

HAL Id: tel-00175259

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00175259>

Submitted on 27 Sep 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Joseph Fourier Grenoble 1
École Doctorale : Chimie et Sciences du Vivant

Année 2006

Titre de la thèse:
**MSBP, une protéine identifiée comme une
cible de la S100B, impliquée dans la
distribution subcellulaire des
mitochondries.**

Soutenue le 18/12/2006 par
Arnaud HUBSTENBERGER
(23/03/1980)

Directeur de thèse : Jacques BAUDIER
Co-directeur : Denis ROUSSEAU

Jury:

Stefan NONCHEV : Président
Merle RUBERG : Rapporteur
Joëlle THILLET : Rapporteur
Nathalie SPASSKY : Examineur

REMERCIEMENTS	4
ABREVIATIONS	5
AVANT-PROPOS	7
INTRODUCTION	11
LA S100B	12
La famille des S100	13
La calci-protéine S100B.....	23
LE RESEAU MITOCHONDRIAL	47
Mitochondries : hétérogénéité de distribution, de déplacement, et de morphologie pour une spécialisation fonctionnelle.....	48
Mitochondries et cytosquelette.....	55
Morphologie mitochondriale.....	58
Calcium et contrôle de la mobilité et du positionnement mitochondrial.....	64
Interactions entre le RE et les mitochondries	65
Ancrages des mitochondries à des sites spécifiques : d'autres exemples que le RE	77
Adressage des protéines à la mitochondrie	79
LA FAMILLE AAA	83
Définition	84
Structure	85
Phylogénie.....	86
TUMEURS GLIALES	89
Classification des tumeurs gliales	90
Perte d'hétérozygotie au locus 1p et développement des oligodendrogliomes.....	91
Hétérogénéité cellulaire des astrocytomes	92
Oligodendrogliomes : cellules originelles et expression du marqueur S100B.....	92
RESULTATS	94

IDENTIFICATION ET CARACTERISATION COMME CIBLE DE LA S100B D'UNE PROTEINE IMPLIQUEE DANS LA DISTRIBUTION SUBCELLULAIRE DES MITOCHONDRIES	95
Identification d'une cible mitochondriale de la S100B : une nouvelle protéine, MSBP.....	96
MSBP : nomenclature.....	98
MSBP : phylogenie.....	99
Validation des outils.....	105
S100B/MSBP : une interaction spécifique et régulée par le calcium	108
La S100B inhibe l'oligomérisation de MSBP.....	110
MSBP est une protéine mitochondriale transmembranaire intégrale, localisée aux sites de contacts entre les membranes internes et externes, l'extrémité N-terminale exposée côté cytosol, le domaine ATPase protégé dans la mitochondrie.....	112
L'invalidation partielle de l'expression de la protéine MSBP par une approche siRNA induit un retard dans la différenciation des CPO.....	116
L'invalidation de l'expression de la protéine MSBP inhibe l'accumulation périnucléaire des mitochondries	118
L'inhibition de l'activité ATPase de MSBP, empêche la libération des mitochondries de leur site d'ancrage périnucléaire.....	121
L'invalidation de l'expression de MSBP s'accompagne d'une diminution des interactions physiques et du transfert de la PS entre le RE et les mitochondries.....	124
EXPRESSION DES PROTEINES MSBP DANS LES GLIOMES	126
MSBP2 : un marqueur qui permet de distinguer les oligodendrogliomes des glioblastomes.....	127
Délétion homozygote du gène codant pour MSBP2 dans la lignée oligodendrogliale HS683.....	128
Invalidation de l'expression des protéines MSBP et transformation cellulaire.....	129
Surexpression des protéines MSBP et transformation cellulaire.....	130
DISCUSSION	132
Localisation mitochondriale de MSBP	133
MSBP et l'ancrage périnucléaire des mitochondries	134
Interactions RE-mitochondries et transfert de la PS	137
Spécificité de l'interaction directe entre la S100B et MSBP.....	138
S100B : un senseur à calcium à l'interface MAM mitochondries.....	139
S100B, MSBP et retard de la différenciation des CPO.....	141
MSBP marqueur de classification pour distinguer les oligodendrogliomes des glioblastomes?	141

Distinction entre MSBP2 et MSBP1.....	142
LOH et délétion homozygote du gène codant pour MSBP2.....	143
Invalidation des gènes MSBP et transformation cellulaire	143
Importance du type cellulaire dans la transformation tumorale	144
CONCLUSION GENERALE.....	146
MATERIEL ET METHODE.....	148
BIBLIOGRAPHIE	158
RESUME	185
Identification et caractérisation comme cible de la S100B d'une protéine impliquée dans la distribution subcellulaire des mitochondries	185
Expression des protéines MSBP dans les gliomes	186

Remerciements

Je tiens à remercier :

Les membres du Jury d'avoir accepté d'examiner ce travail de thèse.

Jacques Baudier, directeur du laboratoire et de ma thèse, et Denis Rouseau, co-directeur de ma thèse, un tandem, une équipe de choc qui m'aura permis d'apprendre à m'adapter à toutes les situations.

Christelle Benaud, la fausse discrète, qui n'a pas fait que m'assurer (à l'escalade) et me rassurer et qui ne compte pas le temps et les conseils qu'elle peut donner aux autres.

Nicole Assard la maman du labo : comme toutes les mamans, on n'aime pas se faire gronder par elle, mais qu'est ce qu'on serait embêté si elle n'était pas là ! Rien ne serait plus en ordre de marche.

Nathalie Bertachi, madame 11h30 pétantes, sans laquelle les départs pour le déjeuner ne seraient pas ce qu'ils sont, et qui m'a aidé pour la culture cellulaire et les immunofluorescences.

Christian Delphin, monsieur force tranquille, dont le calme apparent cache une efficacité redoutable, pas seulement en BM.

Jean Christophe Deloulme, l'artiste du laboratoire, qui peut descendre de son nuage pour donner un regard extérieur, et oui tu vas me manquer surtout le vendredi.

Sonia Lidi et Nicole Lefebvre, les secrétaires qui facilitent notre travail, toujours disponibles, et tellement serviables que certains l'oublient.

L'équipe des thésards et post doc passés et présents : tous dans la même galère, mais dans la bonne humeur : Eric Raponi (T'as raison), Laurent Balanci (mais oui tu vas réussir), Sandrine Serano (mais non t'es pas la seule en galère), Benoit Gilquin (Attention aux excès de vitesse).

Abréviations

- AAA** : ATPases Associées à des Activités variées
- AMPc** : Adénosine 3', 5' Mono Phosphate cyclique
- ANT** : « Adenosin Nucleotide Transporter »
- ARNm** : Acide Ribo Nucléique messenger
- bFGF** : « basic Fibroblast Growth Factor »
- CaM** : protéine CalModuline
- cAMP** : AMP cyclique
- CPO** : Cellules Progénitrices Oligodendrogiales
- Da** : Dalton
- EGF** : « Epidermal Growth Factor »
- EGFP** : « Enhanced Green Fluorescent Protein »
- F1** : sous-unité F1 de l'ATP synthase mitochondriale
- GFAP** : « Glial Fibrillary Acidic Protein »
- IP3** : Inositol Tri Phosphate
- IP3R** : Récepteur à l'Inositol Tri Phosphate
- iNOS** : « inducible Nitric Oxyde Synthase »
- kDa** : kilo Dalton
- KO** : « Knock Out »
- LOH** : « Loss Of Heterozygoty »
- LTP** : Potentialisation à Long terme
- MAM** : Membranes Associées aux Mitochondries
- mM** : millimolaire
- NF** : NeuroFilaments
- nM** : nanomolaire
- MSBP** : « Mitochondria S100B Binding Protein »
- NGF** : « Nerve Growth Factor »
- NT-3** : Neurotrophin-3
- PDGF** : « Platelet Derived Growth Factor »
- PE** : PhosphatidylEthanolamine

- PFA** : Paraformaldéhyde
- PKC** : Protéine Kinase C
- PLC** : Phospholipase C
- PS** : PhosphatidylSérine
- PSD** : « PhosphatidylSerine Decarboxylase »
- PSS** : « PhosphatidylSerine Synthase »
- PTP** : « Permeability Transition Pore »
- RAGE** : « Receptor for Advanced Glycation End product »
- RE** : Réticulum Endoplasmique
- RS** : Réticulum Sarcoplasmique
- RyR** : Récepteur à la Ryanodine
- SERCA** : « Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Calcium Atpase »
- siRNA** : « small interference RNA »
- SNC** : Système Nerveux Central
- S100** : protéines Solubles dans 100% de sulfate d'ammonium
- μM** : micromolaire
- UTR** : « UnTranslated », séquence non traduite des ARNm
- VDAC** : « Voltage Dependant Anion Chanel »

Avant-propos

En 1965, dans le but d'identifier des protéines essentielles au bon fonctionnement du système nerveux des mammifères, Moore et McGregor ont mis au point une technique de fractionnement à partir d'extraits protéiques totaux de cerveau de bœuf. Pour être reconnues comme essentielles, les protéines devaient être fortement enrichies dans le cerveau et leurs séquences phylogénétiques conservées. Une fraction protéique répondant à ces critères a été analysée et purifiée. Cette fraction, d'environ 30 kDa, riche en acides glutamiques et aspartiques, est soluble dans une solution saturée en sulfate d'ammonium (à pH 7,2) et a été nommée « S100 » (Moore and McGregore, 1965). En 1977 il a pu être montré que cette fraction consistait en un mélange d'homodimères et d'hétérodimères S100A1 et S100B (Isobe et al., 1977).

L'étude de la protéine S100B est donc ancienne et précède l'identification du gène correspondant et l'apparition des techniques de biologie moléculaire. De nombreuses cibles de la S100B ont ainsi été identifiées par des approches biochimiques. L'interaction de la S100B avec ses cibles résulte d'un mécanisme commun : la fixation du calcium dans la main EF de la protéine S100B induit un changement de conformation qui permet l'exposition de résidus hydrophobes et son interaction avec des partenaires.

L'avènement des techniques de biologie moléculaire et surtout des souris génétiquement modifiées, a permis d'aborder les fonctions de la S100B au niveau de la physiologie de l'organisme. Les souris transgéniques qui surexpriment ou sont invalidées pour la S100B, sont viables et sans phénotypes majeurs. Mais, ce n'est pas parce que la S100B n'est pas essentielle à la survie de l'organisme, qu'elle n'est pas pour autant cruciale pour la robustesse du système dans des conditions particulières : stress, vieillissement, environnements complexes nécessitant des capacités cognitives accrues. Ainsi ces souris présentent des phénotypes subtils : retard de la différenciation des cellules progénitrices oligodendrogiales (CPO), sensibilité accrue aux infarctus, vieillissement accéléré du cytosquelette des neurones, modifications des capacités cognitives.

Cependant, bien que des études portent sur la S100B depuis trente ans, ni les approches réductionnistes de type biochimiques, ni les approches globales de type souris génétiquement modifiées, n'ont permis la compréhension d'une fonction claire et intégrée de la S100B. Les fonctions de la S100B ne sont comprises que de manières fragmentaires et incomplètes. Au niveau moléculaire, la S100B apparaît comme un régulateur, un module, senseur à calcium, réutilisé plusieurs fois au cours de l'évolution pour réguler de manière dépendante du calcium l'activité de ses cibles. Mais il s'est avéré difficile d'intégrer ces fonctions au niveau de la physiologie de l'organisme, de nombreux phénotypes observés chez les souris génétiquement modifiées restent inexpliqués.

Dans ce contexte, pour une meilleure compréhension du rôle de la S100B chez les mammifères, il est nécessaire d'envisager une nouvelle approche. Des observations de phénotypes au niveau cellulaire nous sont apparues comme particulièrement intéressantes pour établir un pont entre physiologie de l'organisme, et fonction moléculaire. Deux études précédentes apportent ainsi des informations sur la fonction de la S100B au niveau cellulaire. D'une part, il a été montré que la S100B stimule le transfert d'un phospholipide, la phosphatidylsérine, entre le réticulum endoplasmique (RE) et la mitochondrie (Kuge et al., 2002). D'autre part, la S100B est nécessaire pour que le calcium soit tamponné de façon correcte (Xiong et al., 2000). Par ailleurs il est connu que ces deux mécanismes sont régulés par l'interaction entre les deux organelles RE et mitochondries (figure 1). L'hypothèse suivante a ainsi été proposée par l'équipe du Docteur Vance : la S100B régulerait la distribution subcellulaire des mitochondries, et notamment leurs interactions avec le RE (Vance et Steenbergen, 2005). Mais cette hypothèse n'a jamais été validée, ni la capacité de la S100B à interagir avec les mitochondries montrée, c'est ce que nous nous proposons de faire ici.

L'objectif de ce travail est double : comprendre comment la S100B pourrait réguler la distribution des mitochondries par l'identification et la caractérisation fonctionnelle d'une cible mitochondriale, et tenter d'intégrer cette fonction dans la physiologie normale et pathologique de l'organisme : la différenciation des oligodendrocytes et le développement des oligodendrogliomes.

Pour identifier une nouvelle cible de la S100B dans les cellules progénitrices oligodendrogliales qui expriment fortement la S100B endogène, nous avons choisi d'utiliser une nouvelle technique, jamais utilisée auparavant dans ce contexte : le Far Western se différencie des techniques plus classiques que sont le double hybride, le pull down, la

coimmunoprécipitation. L'avantage d'une telle technique est qu'elle permet d'identifier des partenaires directs, contrairement aux techniques précédemment citées qui permettent la détection de partenaires indirects au sein de complexes macroprotéiques. Elle permet également la détection de partenaires membranaires insolubles. Enfin cette recherche est orientée pour détecter une cible d'un compartiment spécifique : la mitochondrie.

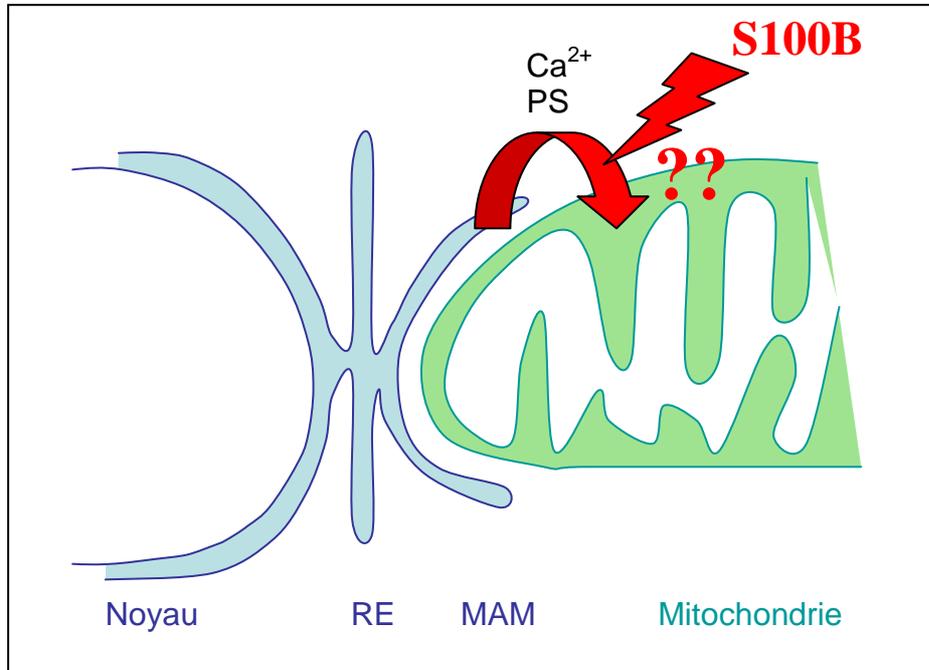


Figure 1 : problématique

Les microdomaines d'interactions physiques entre le RE et les mitochondries sont essentiels pour le transfert direct de phosphatidylserine (PS), sans transport vésiculaire, et les transferts quasi synaptiques de calcium. Les concentrations de ce dernier peuvent atteindre 15 μM à l'interface entre les deux organelles. La calciprotéine S100B stimule le transfert de PS du RE vers les mitochondries (Kuge et al., 2001). L'inactivation de la S100B s'accompagne d'une augmentation de l'amplitude et de la durée des « transients calciques » (Xiong et al., 2000) qui pourraient résulter d'une incapacité des mitochondries à tamponner les libérations de calcium par le RE. Il a ainsi été proposé que la S100B régule les interactions entre le RE et les mitochondries (Vance et Steenbergen, 2005), qui sont par ailleurs régulées par le calcium (Wang et al., 2000). Mais, ni la capacité de la S100B d'interagir avec les mitochondries, ni l'identification de sa cible et de sa fonction moléculaire n'ont été montrées. MAM : membranes associées aux mitochondries.

Nous avons ainsi identifié comme cible de la S100B une protéine sur laquelle il n'existait aucune étude spécifique préalable. Cette protéine appartient à la famille AAA, et nous l'avons nommée MSBP pour Mitochondria S100B Binding Protein. Après avoir validé la spécificité de cette interaction, différentes techniques de biologie cellulaire ont été mises en oeuvre : siRNA ou utilisation de mutants, cela afin de montrer l'importance de cette cible dans la distribution subcellulaire des mitochondries, et nous avons tenté d'intégrer la fonction de cette

cible de la S100B dans une fonction déjà connue de la S100B, la régulation de la différenciation des CPO. Enfin, les caractéristiques de la nouvelle cible identifiée, nous ont poussé à la replacer dans un contexte pathologique : le développement des oligodendrogliomes.

Afin de replacer les résultats dans leur contexte, est présentée au début de ce travail une introduction détaillée sur : la S100B, les mécanismes qui régulent la distribution des mitochondries et leurs implications fonctionnelles, la famille AAA de la nouvelle cible de la S100B.

Introduction

La S100B

La famille des S100

La main EF

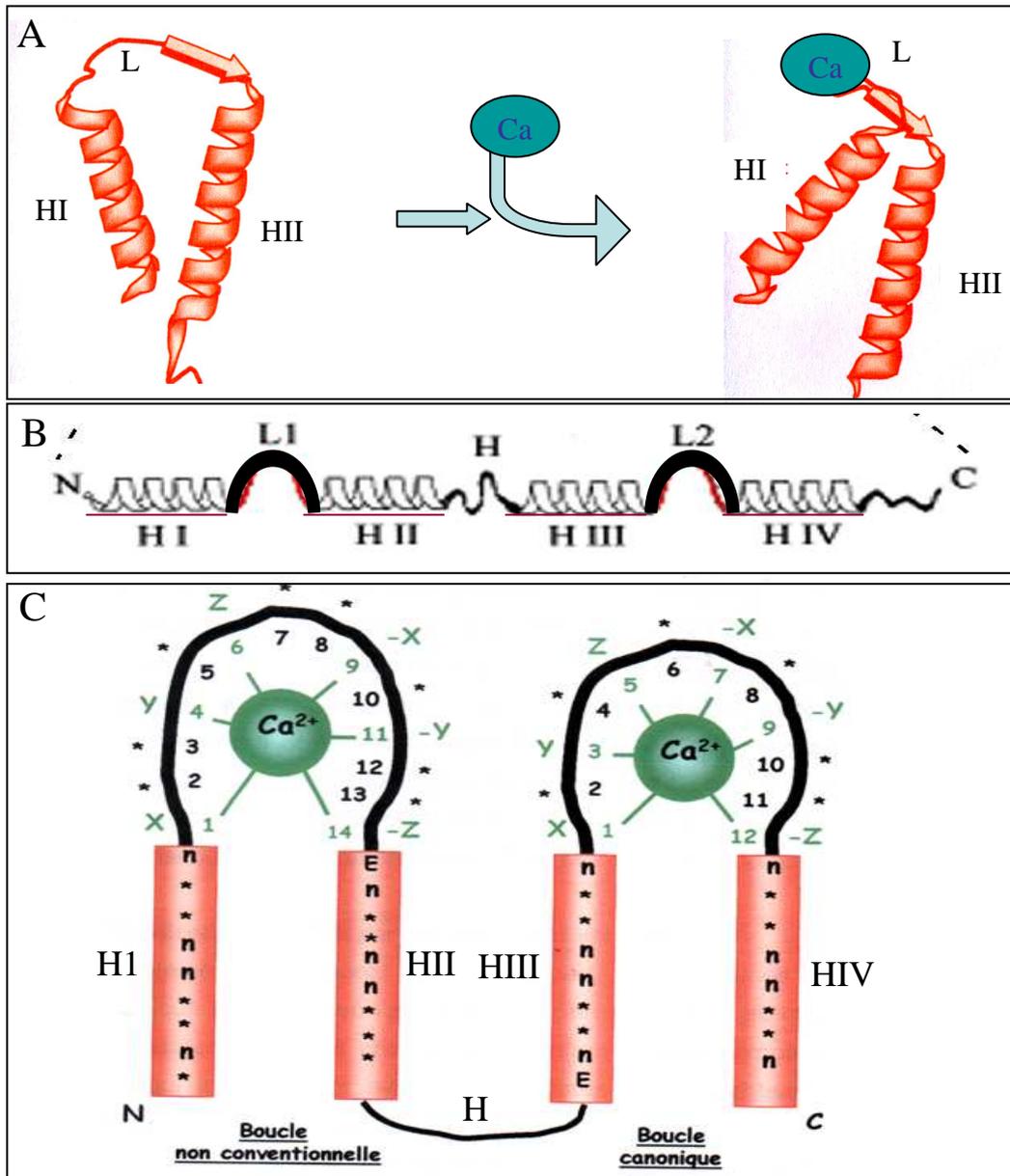


Figure 2: Les protéines S100 se définissent d'un point de vue structural par la succession de deux domaines de fixation du calcium, les mains EF.

(A) Représentation schématique en ruban des structures tertiaires d'une main EF. La structure tertiaire d'une main EF se caractérise par la succession d'une hélice (HI), d'une boucle (L), et d'une deuxième hélice (HII). La fixation du calcium (Ca^{2+}) induit un changement drastique de la conformation de la main EF.

(B) Structures secondaires des S100. Les S100 se caractérisent par la succession de deux mains EF. La main EF N-terminale comporte l'hélice I (HI), la boucle de fixation du calcium I (LI), l'hélice II (HII), séparées par un

bras flexible H (Hinge) de la main EF C-terminale qui comporte l'hélice III (HIII), la boucle de fixation du calcium II (LII) et l'hélice IV (HIV).

(C) Représentation schématique des résidus qui coordonnent la fixation du calcium dans les protéines S100. Les positions des résidus qui coordonnent le calcium sont représentées en vert. La boucle non conventionnelle située en N-terminal présente une affinité pour le calcium plus faible que la boucle canonique en C-terminal.

Le motif de la main EF a initialement été identifié au sein de la structure de la parvalbumine il y a 30 ans par Krestinger et Nockolds et décrit de la façon suivante : deux hélices α séparées par une boucle de 12 résidus qui permettent la fixation du calcium (Figure 2A). Aujourd'hui, jusqu'à 600 membres de la famille à domaine main EF ont été identifiés dans le génome humain (Ikura and Ames, 2006). Les analyses structurales montrent que les résidus impliqués dans la fixation du calcium forment un arrangement conservé, un arrangement pentagonal bipyramidal autour du calcium. En détail, sont impliquées dans la fixation, les chaînes latérales aux positions 1, 3, 5, 9 (via l'eau) et 12 ainsi que le groupe carbonyle à la position 7 (Strynadka and James, 1989) (Figure 2C). Une préférence forte existe pour l'aspartate et le glutamate en position 1 et 12 respectivement, et la glycine en position 6. Les mains EF fonctionnelles sont retrouvées par paires (Shaw et al., 1990), et cette association est nécessaire pour le repliement de la protéine et ses changements de conformation lors de la fixation du calcium. Typiquement il y a coopérativité entre les deux sites de fixation du calcium (Bhattacharya et al., 2004; Ikura, 1996). De nombreuses protéines à main EF, comme les membres de la famille calmoduline ou NCS (Neural Calcium sensor), sont constituées de 4 mains EF. Ce qui résulte en deux unités structurales globulaires dans une seule protéine. En revanche les membres de la famille S100 ne portent que deux mains EF (figure 2B). Les S100 sont présentes sous forme de dimères étroitement associés, les 4 mains EF forment ainsi une unité, un module structural unique.

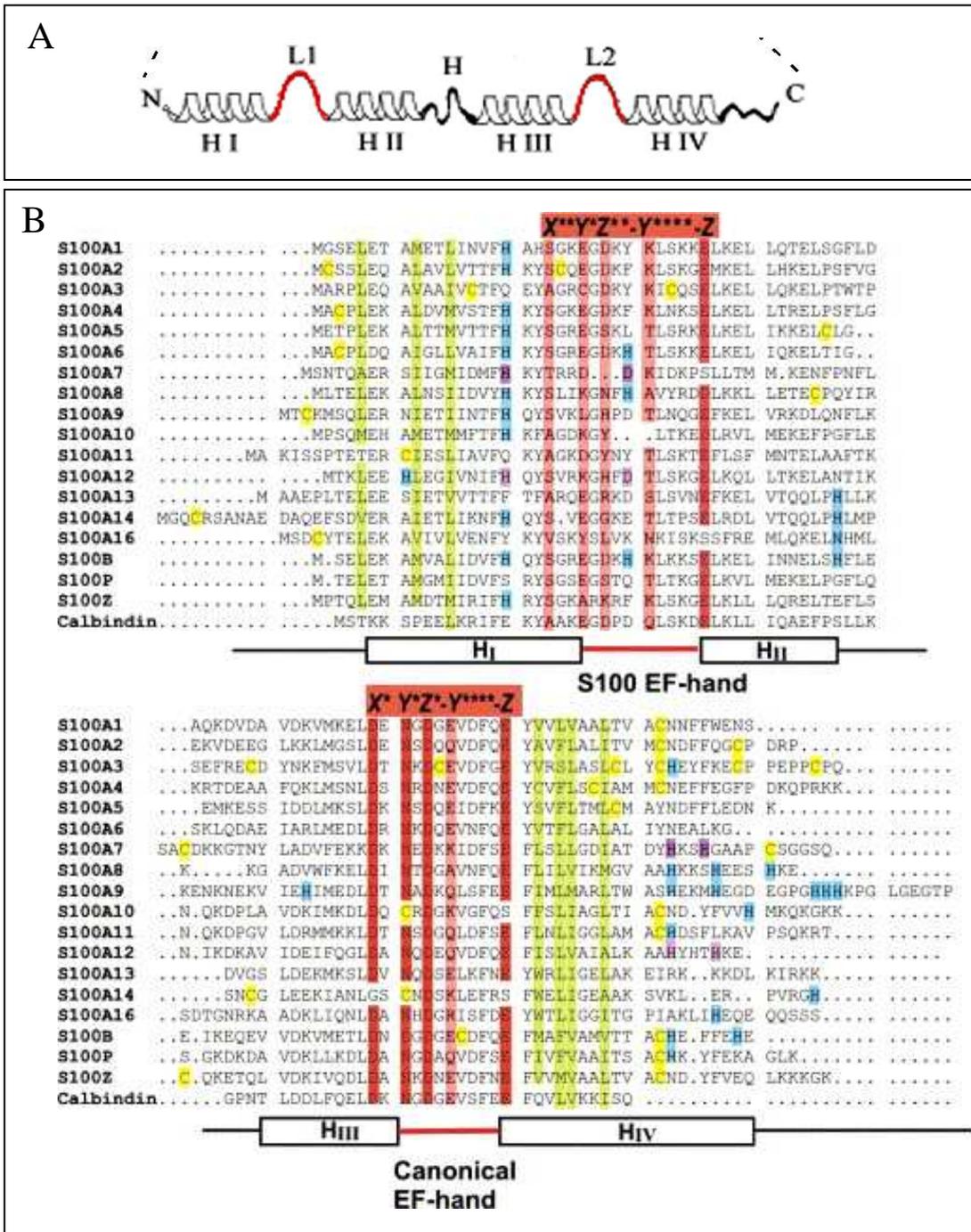


Figure 3 : Alignement des séquences en acides aminés des protéines S100 humaines

(A) Rappel de la structure secondaire des protéines S100 (cf Figure 1).

(B) Alignement des séquences S100 humaines. Les résidus qui coordonnent le calcium sont en rouge foncé (coordination par les chaînes latérales des acides aminés) et en rouge clair (coordination par les oxygènes de la chaîne principale). Les résidus qui coordonnent le zinc dans la S100A7 et le cuivre dans la S100A12 sont en magenta. Les résidus hydrophobes impliqués dans la dimérisation sont en vert. Les résidus qui pourraient fixer le zinc dans les autres S100 sont en jaune (cystéines) et en bleu (histidines). Les régions les plus variables sont le bras flexible (H) et les extensions C-terminales, impliqués dans la fixation de la protéine cible (d'après Marenholz et al., 2004).

La fonction des mains EF dans la signalisation calcique a d'abord été établie pour la calmoduline, impliquée dans la fixation du calcium (Teo and Wang, 1973) et l'activation de phosphodiesterase des nucléotides 3', 5' cycliques (Cheung, 1970). Ensuite l'analyse structurale a permis de montrer le réarrangement calcium dépendant des hélices (Ikura et al., 1992) qui permet l'exposition d'une surface hydrophobe impliquée dans l'interaction de la calmoduline (CaM) avec ses cibles. Un mécanisme similaire a été décrit pour la troponine C, et les S100, d'autres membres de la famille à main EF (Gagne et al., 1995; Strynadka et al., 1997).

Historique des S100

Afin de découvrir des protéines essentielles au fonctionnement du système nerveux central (SNC), Moore et McGregor ont mis au point, en 1965, une technique de fractionnement à partir d'extraits totaux de cerveaux de bœuf. Ils ont ainsi pu isoler une fraction sub-cellulaire, soluble dans une solution de 100% de sulfate d'ammonium à pH neutre, qu'ils ont logiquement nommée "S100" (Moore, 1965; Moore and McGregor, 1965). Les protéines contenues dans cette fraction résultent de l'assemblage de deux sous unités protéiques, nommées $\alpha/A1$ et β/B , s'assemblant en homo et hétérodimère (Isobe et al., 1977). Le séquençage de ces sous-unités a révélé une très grande homologie de séquences primaires ainsi que la présence, à l'intérieur de chacune d'entre elles, de deux sites de liaison au calcium de type main EF (Isobe and Okuyama, 1978) (figure 2). Sur des critères d'homologies de séquences et de structures, près de 25 protéines S100 ont pu être identifiées, constituant une nouvelle famille au sein des calciprotéines à motif EF-hand. Les S100 sont de petites protéines acides (10-12 kDa) qui se composent de deux motifs à mains EF flanqués par des régions hydrophobes conservées et séparés par une région linker (Schafer and Heizmann, 1996) (figure 3).

Phylogénie des S100

Bien que la troponine C et la CaM, d'autres membres de la super famille à main EF, aient des homologues, chez les invertébrés et les protozoaires respectivement, les protéines S100 ne sont présentes que chez les vertébrés (Donato, 2001; Schafer and Heizmann, 1996). L'analyse des génomes eucaryotes non vertébrés, comme les nématodes, les insectes, les protozoaires n'ont pas permis pour l'instant d'identifier de séquences identiques aux S100. La famille des

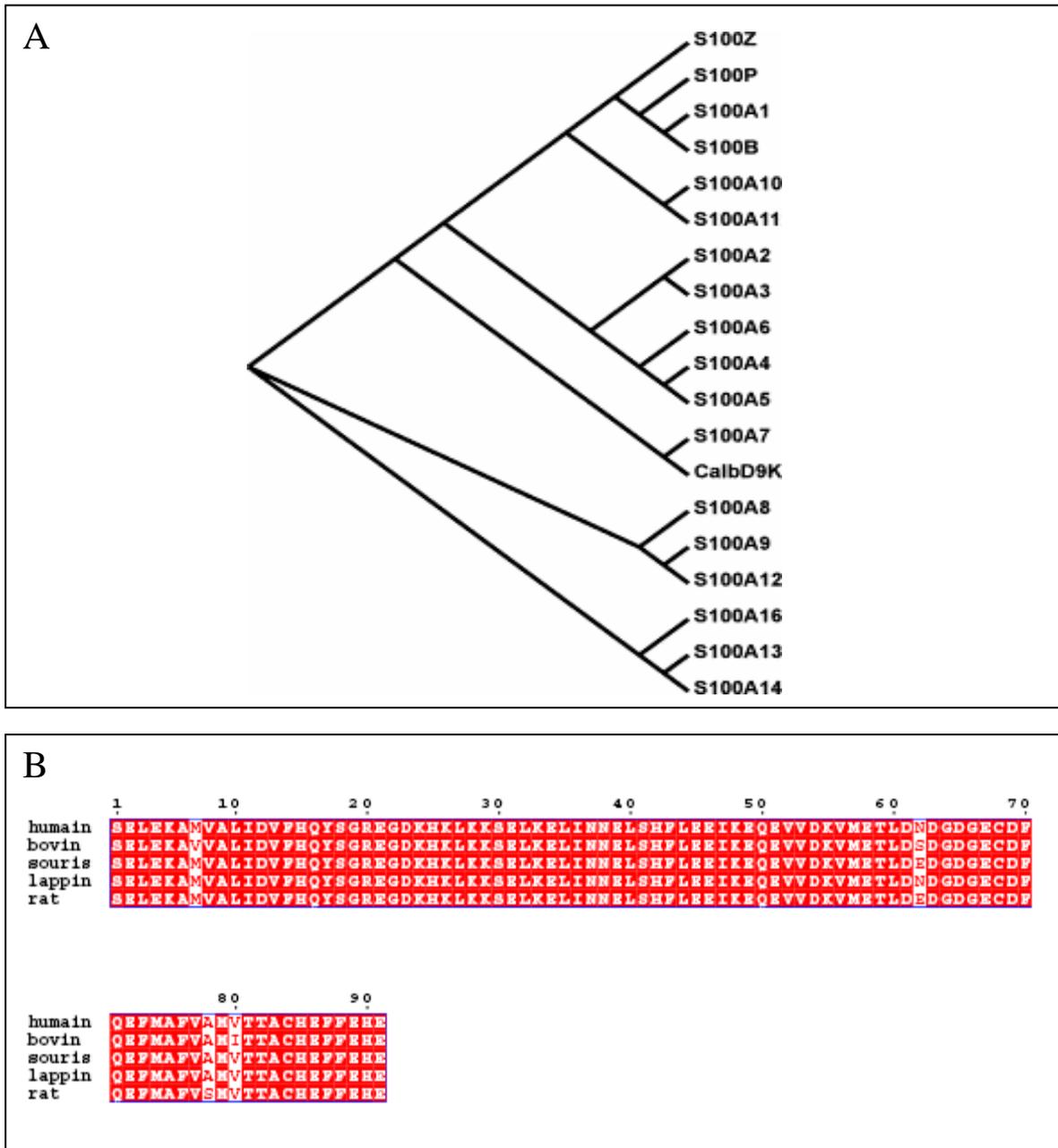


Figure 4 : Phylogénie dans la famille S100, une famille récente à diversification rapide.

(A) Arbre phylogénique des protéines S100 mammifères. L'arbre se divise en quatre branches majeures. La longueur des branches ne correspond pas aux divergences évolutives relatives. Représentée uniquement chez les vertébrés, la famille des S100 est apparue de façon tardive au cours de l'évolution, elle s'est néanmoins rapidement diversifiée (d'après Marenholz et al., 2004).

(B) Alignement des acides aminés des protéines S100B de mammifères.

S100 forme donc un groupe phylogénique récent qui s'est rapidement diversifié : ses 25 membres constituent la plus grande sous famille des protéines à mains EF (Figure 3 et 4).

Mais, cette évolution rapide ne se réduit pas à des duplications géniques, les séquences divergent rapidement. Les protéines S100 présentent 25 à 65 % d'identité pour les acides

aminés. Les régions les plus variables sont la séquence linker et les extensions C-terminales, impliquées dans la fixation de la protéine cible (figure 3B).

Un arbre phylogénique construit sur la base d'un alignement multiple des protéines humaines de souris et de rat révèle quatre sous groupes majeurs (Figure 4A). Le premier sous groupe comprend la S100B, la S100A1, la S100P et la S100Z, et à part la S100A10 et la S100A11. Le deuxième est constitué de la S100A2, la S100A3, S100A4, S100A5 et la S100A6, le troisième la S100A8, S100A9 et la S100A12, et le quatrième plus dispersé comprend la S100A13, S100A14 et S100A16.

L'apparition tardive des S100 au cours de l'évolution pourrait expliquer que ces protéines ne soient pas impliquées dans des processus vitaux. Si l'expression des S100 est modifiée dans de nombreuses pathologies comme la maladie d'Alzheimer, le cancer, l'arthrite rhumatoïde (Odink et al., 1987), que ce soit au niveau de l'organisme ou de la cellule, l'invalidation ou la surexpression de ces protéines n'affecte pas la survie et ne présente pas de phénotype majeur (figure 7).

Nomenclature, localisation chromosomique et organisation des gènes

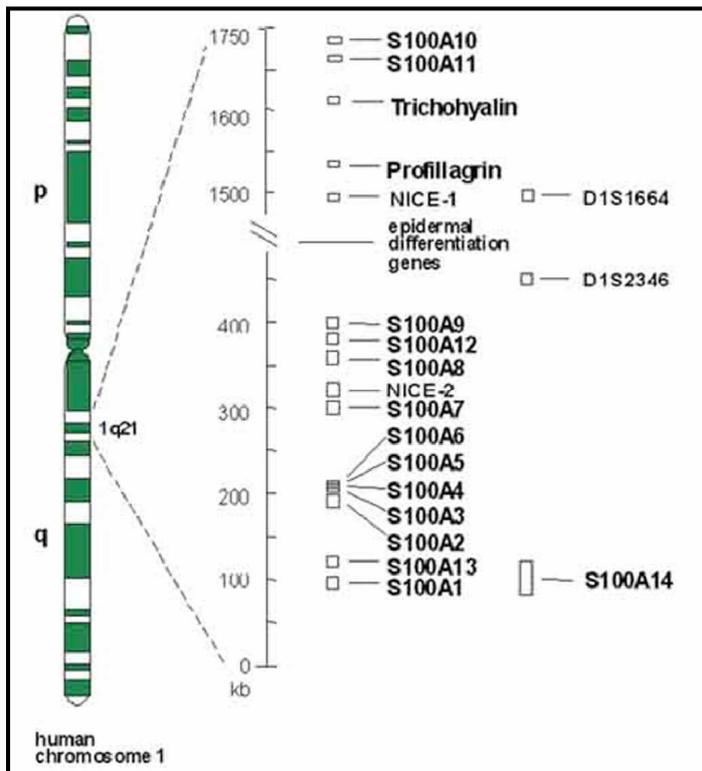


Figure 5 : Organisation des gènes S100A sur le chromosome 1 humain.

La majorité des gènes S100 sont regroupés au locus 1q21 (d'après Schafer et al., 1996).

Les gènes S100 localisés en cluster au locus 1q21 sont désignés par les chiffres arabes consécutifs placés derrière le symbole S100A contrairement aux gènes S100 localisés dans d'autres régions chromosomiques qui portent une lettre unique derrière le symbole S100 (Figure 5). La seule exception est CALB3, qui a initialement été identifié comme un membre de la famille des calbindines. Les pseudogènes portent le suffixe P derrière le symbole S100. Dans cette famille, 21 membres, S100A1-S100A18, trichohylin, filaggrin et repetitin, sont disposés en cluster sur le chromosome 1 au locus 1q21 (Figure 5), tandis que les autres membres, S100P, S100Z, S100B, S100G, sont positionnés aux loci 4p16, 5q14, 21q22, Xp22 respectivement.



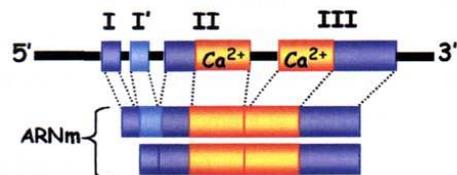
A1, A2, A3, A4 (m), A6, A7, A8, A9, A10, A12, A13, S100B



A11



A5, A14



A4

Figure 6 : Structure des gènes S100.

Les blocs représentent les différents exons (blocs orange : les exons traduits, blocs bleus : les exons non traduits), les traits noirs qui les relient les introns.

Les gènes représentés sont les gènes humains, sauf ceux annotés (m), pour les gènes murins.

L'organisation générale des gènes codant pour les différentes isoformes S100 est extrêmement conservée ; ces gènes étant composés de 3 exons et de deux introns (Kiewitz et al., 2000) (Figure 6). L'exon I code pour des séquences 5' non traduites, alors que l'exon II

contient à la fois une séquence 5' non traduite et l'extrémité N-terminale du premier motif EF-hand . Le second motif EF-hand ainsi que la partie C-terminale traduite et non traduite se situent tous deux dans l'exon III (Figure 6). Seules, la S100A11, la S100A5, la S100A14, et S100A4 humaine font exception à cette organisation génique. Enfin un autre élément caractéristique des gènes S100 est la présence de l'élément SPE (*S100 Protéin Element*) situé dans la région promotrice de tous les gènes et dont la fonction reste encore inconnue (Stuve and Myers, 1990; Zimmer et al., 1996). Malgré ces nombreuses similitudes, le patron d'expression tissulaire et cellulaire de chaque S100 est tout de même très spécifique. Les éléments et séquences promotrices responsables de cette spécificité restent encore largement méconnus.

Caractéristiques originales des S100

Trois caractéristiques distinguent les protéines S100 des autres membres de la famille des protéines à main EF.

Tout d'abord, dans chaque monomère les deux mains EF diffèrent par leur séquence et leur mode de coordination du calcium (figure 2C). La main EF C-terminale, composée de 12 résidus, fixe le calcium d'une manière similaire à la CaM et la troponine C. C'est le site de haute affinité avec un Kd compris entre 10 et 50 μ M. La main EF N-terminale, composée de 14 résidus, pseudocanonique, fixe le calcium par la chaîne principale, excepté pour la chaîne latérale du glutamate en dernière position, c'est le site de basse affinité avec un Kd compris entre 200 et 500 μ M. La main N-terminale semblerait donc incapable de fixer les ions calcium à des concentrations physiologiques.

La seconde caractéristique unique des S100 est la formation de dimères (figure 8). Des expériences in vivo et in vitro confirment que la plupart des S100 (S100A4, A6, A7, A8, A10, A11, A12 et S100B) existent sous forme d'homodimères. Cependant, elles peuvent aussi former des hétérodimères, comme c'est le cas pour S100A1 et S100B, S100A1 et S100A4, S100A6 et S100B, S100A11 et S100B ainsi que S100A8 et S100A9 (Deloulme et al., 2000; Hunter and Chazin, 1998; Isobe et al., 1981; Tarabykina et al., 2000; Wang et al., 2000a; Yang et al., 1999). Cette caractéristique permet des échanges dynamiques, et des combinaisons de dimères variées suivant les monomères présents dans le compartiment cellulaire.

Enfin les S100 ne sont pas ubiquitaires, mais sont exprimées de manière spécifique dans les tissus et cellules. Plus récemment, il a été montré que certaines S100 peuvent aussi avoir une fonction extracellulaire. Cependant, si une action extracellulaire a bien été décrite pour les

isoformes A1, A2, A4, A7, A8, A9, A10, A12 et B, seule la sécrétion des protéines S100A8, A9 et B a pu être mise en évidence. Ces effets extracellulaires varient suivant les isoformes et les concentrations utilisées.

S100A1	KO	Contractions cardiaques faiblement modifiées	Du, Cole, 2002
S100A1	KO	Contractions cardiaques faiblement modifiées	Marenholz, 2004
S100A1	KO	Contractions cardiaques faiblement modifiées	Most, 2003
S100A4	KO	Augmentation des tumeurs spontanées	Naaman, 2004
S100A4	TS	Augmentation des métastases dans un modèle de tumeur chez la souris	Ambartsumian, 1996
S100A4	TS	Augmentation des métastases dans un modèle de tumeur chez la souris	Davies, 1996
S100A8	KO	Létal aux stades embryonnaires	Passey, 1999
S100A9	KO	Absence de phénotype évident	Hobbs, 2003
S100A9	KO	Absence de phénotype évident	Manitz, 2003
S100A11	KO	Absence de phénotype évident	Mannan, 2003
S100B	KO	LTP et Mémorisation accrue	Nishiyama, 2002
S100B	KO	Altération homéostasie calcique Epilepsies plus fréquentes Hypertrophie cardiaque accrue Retard de différenciation des CPO	Xiong et al., 2000 Dyck, 2002 Tsoporis, 2005 Deloulme
S100B	TS	Astrocytose et prolifération des neurites	Reeves, 1994
S100B	TS	Inhibition de l'hypertrophie cardiaque Mémorisation et apprentissage perturbé Activité explorative perturbée Vieillesse accélérée du cytosquelette dans les neurones	Tsoporis, 1998 Winocur, 2001 Bell, 2003 Shapiro and Whitaker-Azmitia, 2004

Figure 7 : Modèles génétiques S100 chez la souris.

Il est important d'observer qu'à l'exception de la souris S100A8 KO, les autres modèles de souris pour lesquels l'expression d'une S100 est perturbée ne présentent pas de phénotypes majeurs. KO : invalidation du gène. TS : souris transgénique. Chaque case correspond à un modèle de souris génétiquement modifiée.

Le nombre élevé des S100, les différentes combinaisons de dimères, les Kd pour le calcium spécifiques à chaque S100, leurs interactions dépendantes du calcium avec des cibles, leurs expressions tissus spécifiques, offrent des outils variés et flexibles pour réguler différents processus biologiques dépendants du calcium. Ainsi les S100 sont impliquées dans des fonctions très diverses: régulation du cycle cellulaire, différenciation cellulaire, migration

cellulaire... Malgré ces fonctions très diverses, un mécanisme d'action commun se dessine : Les S100 interagissent de manière dépendante du calcium avec une cible et ainsi régulent leur activité enzymatique, leur phosphorylation, ou séquestrent les monomères empêchant ainsi la formation d'oligomères. (Figure 5). Toutefois ces études ont été principalement réalisées *in vitro*, et malheureusement leur fonction *in vivo* est encore largement méconnue.

Structure des protéines S100 : des senseurs à calcium

Au cours des dix dernières années la structure tri-dimensionnelle des protéines S100 a été déterminée sans fixation du calcium (apo) (Arnesano et al., 2005; Dempsey et al., 2003; Drohat et al., 1999; Kilby et al., 1996; Lee et al., 2004a; Maler et al., 1999; Mittl et al., 2002; Otterbein et al., 2002; Potts et al., 1995; Rety et al., 1999; Rustandi et al., 2002; Valley et al., 2002), avec fixation du calcium (Arnesano et al., 2005; Brodersen et al., 1998; Brodersen et al., 1999; Drohat et al., 1998; Ishikawa et al., 2000; Maler et al., 2002; Moroz et al., 2001; Otterbein et al., 2002; Sastry et al., 1998; Smith and Shaw, 1998; Zhang et al., 2003), et avec fixation de la cible (Bhattacharya et al., 2003; Inman et al., 2002; Itou et al., 2002; Koch M., 2006; McClintock and Shaw, 2003; Rety et al., 2000; Rety et al., 1999; Rustandi et al., 2000) (figure 8). Ces structures ont révélé que le changement de conformation induit par le calcium résulte dans l'exposition d'une surface hydrophobe, comme pour la CaM et la Troponine C, ce qui permet aux S100 d'interagir avec leurs cibles. Dans toutes les structures de S100 déterminées jusqu'à présent, à l'exception de la S100G, les S100 existent comme un dimère symétrique, avec chaque monomère comportant deux motifs à main EF. La main EF N-terminale comporte l'hélice I (HI), la boucle I (site de fixation du calcium (LI)), l'hélice II (HII), séparées par un bras flexible (H) de la main C-terminale qui comporte l'hélice III (HIII), la boucle II (site de fixation du calcium (LII)), et l'hélice IV (HIV). L'interface du dimère se compose des hélices I et VI de chaque monomère. Ce dimère est maintenu que l'enzyme soit sous la forme Hapo ou Holo.

Si les S100 partagent une même structure, elles pourraient également partager certaines fonctions, ainsi différents membres de la famille peuvent interagir et réguler la même protéine cible. Par exemple S100B, S100A1, S100A12 et S100P fixent le récepteur RAGE (Arumugam et al., 2004; Hofmann et al., 1999; Huttunen et al., 2000); la S100A1, S100A6 et S100B fixent l'annexine A6 (Arcuri et al., 2002; Garbuglia et al., 1998; Zeng et al., 1993); la S100A1, S100A2, S100A4 et S100B interagissent avec le suppresseur de tumeur p53 (Fernandez-Fernandez et al., 2005; Grigorian et al., 2001; Mueller et al., 2005; Rustandi et al., 2000); la S100B, S100A6, S100A12 et la S100A1 forment des complexes avec la

protéine d'ubiquitination CacyBP/SIP (Calcyclin-binding protein/Siah-1- interacting protein) (Filipek et al., 2002; Polyakov et al., 1998).

Enfin, bien que les protéines S100 soient classifiées comme des protéines avec des sites de fixation du calcium (les mains EF), des structures à résolution fine, des mesures de fixation du calcium, et des comparaisons de séquences montrent que quelques protéines contiennent des mains EF non fonctionnelles, qui ne fixent pas le calcium (Marenholz et al., 2004).

La calci-protéine S100B

La S100B introduction

La protéine S100A1 et la protéine S100B sont les deux S100 les plus étudiées, probablement en raison de l'ancienneté de leur découverte. Cependant, des deux protéines, la S100B suscite beaucoup plus d'intérêt du fait de la localisation de son gène sur le chromosome humain 21. Chez les malades atteints de trisomie 21, la surexpression de S100B dans les astrocytes et la microglie semble être corrélée à la formation des plaques amyloïdes dans le cerveau (Stanley et al., 1994). Par ailleurs, une sur-expression de S100B est aussi observée dans le cerveau de malades atteints de la maladie d'Alzheimer, du syndrome de Down ou du SIDA (Griffin et al., 1989; Griffin et al., 1995; Marshak and Pena, 1992; Marshak et al., 1992; Mrak et al., 1996; Sheng et al., 1996). Ces observations suggèrent que la S100B pourrait participer au développement neuropathologique de ces maladies.

Gène et régulation séquence

Les gènes de la S100A1 et S100B sont très conservés d'une espèce à l'autre chez les vertébrés avec, par exemple, 85% d'identité entre les formes exprimées chez le rat et l'homme (Allore et al., 1990; Jiang et al., 1993; Maeda et al., 1991) (Figure 4B). Les gènes codant pour les protéines S100B et S100A1 présentent des caractéristiques communes avec les autres membres de la famille des S100. Des éléments importants situés sur les séquences promotrices des gènes codant pour les protéines S100A1 et la S100B et reconnus par les facteurs de transcriptions CREB et AP2, pourraient expliquer certains effets *in vitro* observés lors de traitements capables de stimuler l'élévation d'AMPc (Roesler et al., 1988). Un analogue de l'AMPc, le dibutryl AMPc qui stimule la maturation des cellules gliales C6 et des astrocytes en culture, augmente aussi la quantité des messagers codant pour les protéines S100A1 et S100B (Kahn et al., 1991; Labourdette and Mandel, 1980). Par ailleurs, les glucocorticoides, comme la dexaméthasone et la protéine β -amyloïde, stimulent la synthèse de l'ARNm codant pour la protéine S100B, alors qu'elle est réprimée sous influence de l'IL1b (*interleukine 1b*) et du bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*) (Mrak and Griffinbc, 2001).

In vitro, il a aussi été démontré que l'expression de la protéine S100A1 était augmentée en réponse à la différenciation des cellules neuronales ou musculaires, par le facteur de croissance neuronal NGF (*Nerve Growth Factor*) (Zimmer and Landar, 1995).

Localisation cellulaire et tissulaire des protéines S100A1 et S100B

Les études sur la localisation tissulaire mais surtout cellulaire des protéines S100A1 et S100B sont nombreuses et pour certaines controversées voire contradictoires. Ces controverses et contradictions sont essentiellement dues au fait que les premiers anticorps générés contre la fraction "S100" du cerveau reconnaissent aussi bien la S100B que la S100A1, mais aussi pour certains anticorps d'autres membres de la famille des S100 (Schafer and Heizmann, 1996). Depuis, d'autres membres de la famille des S100 ont été caractérisés dans le cerveau comme la S100A2, S100A4 et S100A6 (Donato, 2001).

Le système nerveux central est formé par l'encéphale (cerveau, tronc cérébral et cervelet) et la moelle épinière. Il est constitué de neurones, de cellules gliales et de capillaires sanguins. Il existe quatre variétés de cellules gliales : les astrocytes, les oligodendrocytes, les cellules épendymaires ainsi que les cellules microgliales. La majorité des études concernant l'expression des protéines S100 dans le SNC a été réalisée au niveau du cerveau (Yoshikawa et al., 2000). Chez l'homme, le marquage "S100" apparaît précocement, après 10 semaines de gestation, et son intensité augmente tout au long de la vie (Zuckerman et al., 1970). Ce phénomène est également observé chez les rongeurs (Landry et al., 1989).

Au cours du développement, une progression postéro-antérieure du signal A1/B (ou "S100") est détectée dans les cellules gliales du cerveau (Sarnat, 1992; Yang et al., 1995a; Yang et al., 1995b). Les cellules S100 positives sont souvent cataloguées comme cellules astrogliales uniquement sur la base de leur morphologie (Landry et al., 1989; Yang et al., 1995a; Yang et al., 1995b). La ligne médiane du raphé, structure gliale radiaire présente transitoirement du 15^{ème} jour embryonnaire (E15) au 8^{ème} jour post-natal (PN8) chez les rongeurs (Gomez et al., 1990; Van Hartesveldt et al., 1986) ainsi que d'autres glies radiaires, comme celles responsables de la migration des neurones de Purkinje du cervelet de E13 à PN2, chez le hamster, possèdent également un immunomarquage "S100" (Sievers et al., 1994).

Au stade adulte, un signal "S100" a été détecté, *in vivo* et *in vitro*, dans différentes cellules comprenant principalement les astrocytes et dans une moindre mesure, les épendymocytes et certaines sous-populations de neurones et d'oligodendrocytes myélinisants (Rickmann and Wolff, 1995a; Rickmann and Wolff, 1995b; Yang et al., 1995a; Yang et al., 1995b).

Dans le cerveau adulte, la S100B constitue 0,5% des protéines cytoplasmiques dans les astrocytes, il s'agit donc d'une protéine très abondante, et elle s'accumule notamment dans les pieds astrocytaires (Kligman and Hilt, 1988; Rickmann and Wolff, 1995b). D'autre part, aussi bien au cours du développement du SNC que chez l'adulte, la S100B s'accumule de façon transitoire dans les cellules progénitrices oligodendrogiales (CPO), lors de la transition entre un état multipotent, où les cellules se divisent rapidement, et un état de cellules morphologiquement différenciées.

Il est important de souligner qu'un signal "S100" a également été observé dans des cellules gliales spécialisées chez l'adulte, mais ayant conservé certaines caractéristiques d'immaturité. Ces cellules correspondent à la glie de Bergmann au niveau du cervelet (Landry et al., 1989) aux cellules de Müller de la rétine (Das et al., 1984; Rambotti et al., 1999) ainsi qu'aux tancytes du 3^{ème} ventricule (Chouaf et al., 1991; Perez-Martin et al., 2000; Shariful Islam et al., 1998).

Néanmoins, la présence d'un fort signal "S100" dans les astrocytes fibreux et protoplasmiques (Cocchia and Michetti, 1981) associé au fait que la protéine S100B est la protéine S100 majoritaire du SNC, est à l'origine de l'idée très répandue 1) que la protéine S100B est un marqueur spécifique des astrocytes dans différentes espèces et 2) que le signal "S100" se superpose parfaitement au signal S100B (Melzer et al., 1997; Savchenko et al., 2000; Zhang and McKanna, 1997). Cependant il n'existe pas un recouvrement parfait des deux marquages, et la S100B n'est pas un marqueur spécifique des astrocytes dans le système nerveux comme cela est souvent affirmé dans de nombreuses publications.

Si la S100B est très fortement exprimée dans le cerveau et les testicules, elle est aussi exprimée à de moindres niveaux dans le tissu adipeux brun et blanc, la vessie, le colon, l'intestin grêle, le pancréas et la peau ; la rate, l'utérus ou le poumon n'exprimant quasiment pas la protéine (Zimmer et al., 1996). Les tissus contenant du cartilage, comme la trachée et les os, sont susceptibles de contenir de la S100B (Landry et al., 1990). L'expression de la protéine dans un tissu est souvent limitée à quelques types cellulaires, ainsi dans la glande salivaire, seules les cellules myoépithéliales entourant les acini et les cellules des conduits intercalés sont positives à la S100 (Hara et al., 1983).

La protéine S100A1, au même titre que la S100B, n'est pas spécifique d'un tissu ou d'un type cellulaire particulier. Des études par Northern Blot ont ainsi démontré la présence d'ARN messager codant pour la S100A1 dans divers tissus tels que le cœur et la glande submaxillaire, où le signal est fort, ainsi que le muscle squelettique adulte, les reins, la rate, la glande thyroïdienne et le cerveau, où le signal est plus faible (Kiewitz et al., 2000).

Localisation subcellulaire

Les protéines S100A1 et S100B ne se distribuent pas uniformément dans la cellule, elles sont majoritairement cytoplasmiques et dans certains cas peuvent s'accumuler dans le noyau comme dans les astrocytes ou les cellules progénitrices oligodendrogiales (Deloulme et al., 2004). Dans certaines études, elles ont aussi été décrites comme étant associées à des filaments intermédiaires en microscopie électronique (Davey et al., 2001; Hara et al., 1983). Ainsi, leur localisation subcellulaire varie selon le type cellulaire considéré, au niveau des astrocytes par exemple, qui forment des pieds astrocytaires enveloppant les vaisseaux, les deux protéines présentent un marquage nucléocytoplasmique classique mais présentent aussi une nette accumulation dans les pieds astrocytaires. La S100B peut aussi être associée aux membranes nucléaire, mitochondriale, plasmique, et golgienne (Davey et al., 2001; Hara et al., 1983). Enfin, comme décrit ultérieurement dans cette introduction, la S100B peut être sécrétée.

Comme nous le verrons par la suite, à ses localisations tissulaires et subcellulaires variées, correspond une capacité de la S100B à interagir avec des cibles différentes.

Structure tertiaire de la S100B

Les protéines S100A1 et S100B se retrouvent principalement sous la forme d'un dimère parfaitement symétrique (figure 8, figure 9 et figure 11). La présence de calcium a un effet négligeable sur la dimérisation de la S100B, l'équilibre monomère/dimère pour la S100B présente un Kd inférieur à 500 pM (Drohat et al., 1997). La S100B dimérise donc avec une très forte affinité qui est nettement supérieure à celle des homodimères S100A4 ou S100P (Kd \approx 1-2 μ M). Les concentrations intracellulaires de S100B sont élevées, elle a été estimée à 10 μ M dans les cellules gliales (Fano et al., 1995), à cette concentration la S100B est donc exclusivement présente sous forme d'homodimère. Cependant la S100B pourrait former des hétérodimères avec la S100A6 comme décrit dans les mélanomes (Deloulme et al., 2000; Yang et al., 1999), la S100A11, et surtout avec la S100A1 (Deloulme et al., 2000).

A la surface de la structure globulaire du dimère de S100B est exposé un nombre équilibré et très important de charges positives et négatives (Ikura and Ames, 2006), contrairement à la S100A10 et la S100A12, par exemple, qui comportent beaucoup moins de résidus chargés à leur surface.

De nombreuses structures tri dimensionnelles de la S100B ont été obtenues sous différentes formes : sans calcium (Apo) (Drohat et al., 1999; Kilby et al., 1996), avec calcium (Holo) (Drohat et al., 1998; Matsumura et al., 1998; Smith and Shaw, 1998), avec calcium et un

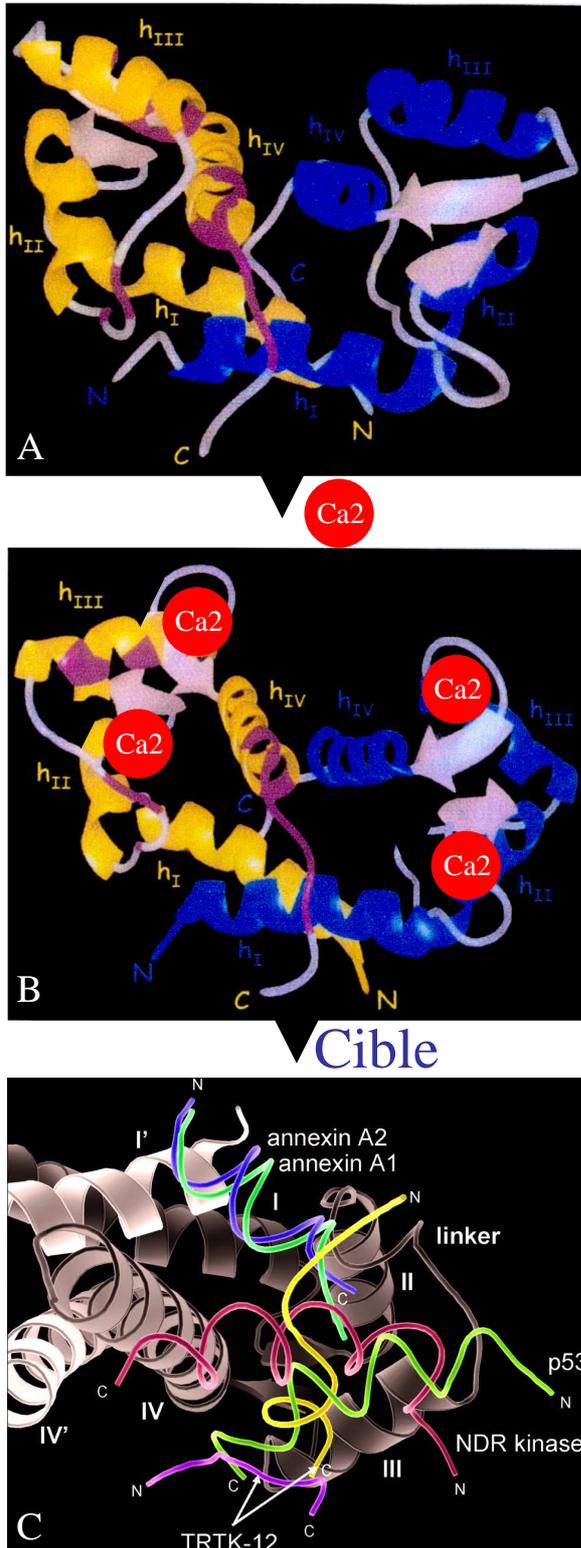


Figure 8 : Structures tertiaires des dimères de la S100B : un senseur à calcium qui interagit de façon calcium dépendante avec ses cibles.

(A et B) Les monomères de S100B sont représentés en jaune et bleu. Les hélices sont indiquées en chiffres romains (I-IV et I'-IV'). La liaison du calcium sur chaque monomère induit une réorientation de l'hélice III et de la région charnière (Hinge, H) ce qui expose un certain nombre de résidus (magenta) des hélices III et IV, de la région hinge et de l'extension C-terminale au solvant. Les ions calcium sont représentés sous forme de points rouges à l'intérieur des boucles de liaison au calcium (L1 L2 et L1' L2') (d'après Drohat et al., 1998).

(C) Orientation des cibles S100 dans le site d'interaction (d'après (Santamaria-Kisiel et al., 2006)). Dans la représentation en ruban de la S100 dans sa conformation calcium fixé, un monomère est en gris foncé (hélices 1, II, III, et IV) et le second en gris clair (hélices I' et IV'). Les représentations de différents peptides cibles, Annexine A2, p53, TRTK12 et NDR, qui interagissent avec la S100, sont superposés. L'annexine A2 est en bleu, la kinase NDR est en cyan, p53 en vert, TRTK12 en jaune et en violet. Il est important d'observer que bien que les différentes cibles de la S100B se fixent dans le même domaine, l'orientation des peptides et les résidus clefs impliqués dans l'interaction varient.

peptide cible (Bhattacharya et al., 2003; Inman et al., 2002; Koch M., 2006; McClintock and Shaw, 2003; Rustandi et al., 2000). La liaison du calcium induit des changements de conformation se traduisant par la réorientation ($\approx 90^\circ$) de l'hélice III (Donato, 2001; Heizmann and Cox, 1998). La S100A1 et la S100B peuvent lier 4 ions calcium par dimère avec des

affinités différentes (Baudier and Gerard, 1986; Baudier et al., 1986) (figure 3). En effet, le site EF-hand N-terminal est de faible affinité ($K_d=200-500 \mu\text{M}$), tandis que le site EF-hand C-terminal est de plus haute affinité ($K_d=10-20 \mu\text{M}$) (Baudier and Cole, 1989).

Les cystéines de la S100B peuvent être S-nitrosylées par des donneurs d'oxyde nitrique endogènes comme le S-nitrosoglutathion, ce qui induit un changement de conformation de la protéine (Zhukova et al., 2004). De telles modifications post-traductionnelles modifient l'affinité de la S100B pour le calcium (Bjor et al., 2006). Par ailleurs, la présence d'un peptide cible de la S100B peut augmenter d'un facteur 3 son affinité pour le calcium (Markowitz et al., 2005; Rustandi et al., 1998). Cependant ces affinités sont extrêmement faibles comparées aux motifs EF-hand de la calmoduline ($K_d = 0.1 \mu\text{M}$ et $1 \mu\text{M}$). Ceci suggère soit que des cofacteurs sont nécessaires à l'activité de senseurs du calcium intracellulaire à des concentrations cytosoliques, soit que l'interaction de la S100B avec ses cibles a lieu dans des micro-domaines à fortes concentrations calciques. Citons par exemple les clusters de canaux calciques à la membrane plasmique, ou l'interface réticulum/mitochondries où les concentrations calciques peuvent être de l'ordre de $15 \mu\text{M}$ (Csordas et al., 1999; Rizzuto and Pozzan, 2006) voir de $100 \mu\text{M}$ à proximité des récepteurs IP3R (Neher, 1998).

La région de fixation des peptides cibles est identique et formée par le linker, les hélices III et IV, et correspond au domaine le plus variable dans la famille des S100, en revanche l'orientation des peptides dans le site de fixation est variable comme cela a été montré pour les peptides p53 (Rustandi et al., 2000), CapZ (Inman et al., 2002), et NDR kinases (Bhattacharya et al., 2003) (Figure 8C). Les peptides p53 et NDR ont une conformation en hélice α , mais du fait de leur orientation les positions divergent de plus de $0,8\text{nm}$ au voisinage de l'hélice IV. La différence est encore plus marquée avec le peptide TRK12 qui est orienté à 90° par rapport aux peptides p53 et NDR (Santamaria-Kisiel et al., 2006). Les acides aminés critiques impliqués dans cette interaction doivent donc varier. Il n'est donc pas surprenant que les différentes séquences consensus proposées pour les cibles de la S100B, « (K/R)(L/I)XWXXIL » (X=variable) (Ivanenkov et al., 1996; Ivanenkov et al., 1995), même les moins contraignantes, « +OXO*XOO » (+=basique, O=hydrophobe, *=hydrophile, X=variable) (McClintock and Shaw, 2000), ne se retrouvent pas dans toutes les cibles de la S100B connues. Cependant un peptide proche de ces consensus, TRTK-12, a été synthétisé et cristallisé avec la S100B (Barber et al., 1999). Il est capable de compéter l'interaction de CapZ α , GFAP, desmine, tubuline et p53 (Bianchi et al., 1996; Garbuglia et al., 1999a;

Garbuglia et al., 1999b), cependant il est incapable de compéter l'interaction S100B Annexin VI (Garbuglia et al., 1998).

La fonction de la S100B semble donc dépendre complètement de sa structure (Figure 8 et figure 9) : la S100B est un senseur à calcium qui interagit de façon dépendante du calcium avec des protéines cibles. Si ce mécanisme semble universel, en revanche la S100B interagit avec de nombreuses cibles et, comme nous le verrons, régule des activités très diverses.

Liaisons au Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+}

La protéine S100B est sujette à l'influence du zinc qui modifie son affinité vis à vis du calcium. Elle dispose de 3 à 4 sites de liaison au zinc par monomère (Figure 3A), distincts des sites de fixation du calcium, et le zinc permet d'augmenter l'affinité de la S100B pour le calcium (Baudier and Gerard, 1986; Baudier et al., 1986). La fixation de zinc sur les deux premiers sites entraîne un changement de conformation de la S100B qui se traduit par un effet coopératif sur la fixation du calcium (Baudier and Gerard, 1986; Baudier et al., 1986), ces sites de fixations ont été confirmés par mutagenèse dirigée (Wilder et al., 2003). Mais en absence de calcium, la fixation du zinc peut induire un changement de conformation suffisant pour permettre l'interaction de la S100B avec une cible comme Tau (Yu and Fraser, 2001). Cependant en raison des faibles concentrations intra-cellulaires du zinc, sa fixation in vivo sur la S100B est improbable (Fritz et al., 2002).

Le magnésium (Mg^{2+}) a, quant à lui, un effet opposé et ne favorise pas la liaison du calcium sur la S100B (Baudier and Gerard, 1986; Baudier et al., 1986).

La protéine S100A1 peut elle aussi fixer les ions zinc, avec une plus grande affinité que la protéine S100B. Cependant, des tests de fixation du calcium sur la protéine S100A1 ayant déjà fixé du zinc, démontrent que les sites de fixation aux différents ions sont distincts et n'agissent pas de manière coopérative (Baudier and Gerard, 1986; Baudier et al., 1986).

Parmi les métaux, la S100B est aussi capable de lier le cuivre, inhibant l'oxydation de L-ascorbate catalysée par le Cu^{2+} (Nishikawa et al., 1997). Le dimère peut en effet lier 4 ions Cu^{2+} qui sont déplacés par $1\mu M$ de zinc suggérant qu'il s'agit des mêmes sites de liaison.

En recherchant des méthodes d'évaluation d'intoxication aux métaux lourds, Levy et ses collaborateurs ont démontré que la S100B peut lier l'aluminium, tout comme la calmoduline (Siegel et al., 1982). Des anticorps monoclonaux dirigés contre l'épitope BSA-aluminium reconnaissent aussi la S100B couplée à l'aluminium ; cette réaction est inhibée par le citrate, un chélateur de l' Al^{3+} (Levy et al., 1998).

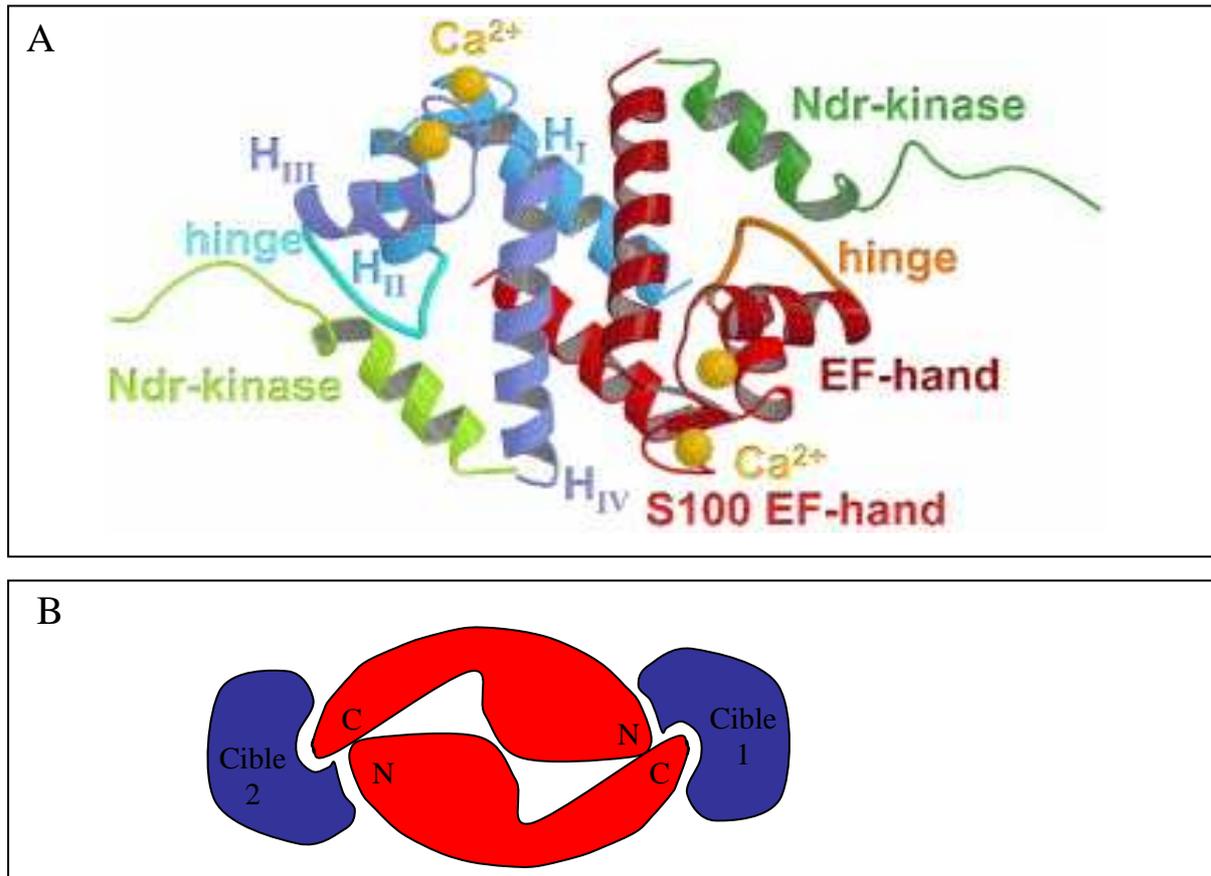


Figure 9 : De la structure à la fonction.

(A) Structure tertiaire d'un dimère de S100B interagissant de façon calcium dépendante avec deux peptides de la protéine NDR (d'après Marenholz et al., 2004).

(B) Représentation schématique de l'interaction d'un dimère S100B avec deux protéines cibles. L'interaction de la S100B peut masquer un site de phosphorylation, ou moduler l'activité d'une cible. La capacité du dimère S100B à interagir avec deux cibles séparées peut expliquer sa capacité à inhiber l'oligomérisation de protéines cibles.

S100B : de nombreuses protéines cibles, mais des mécanismes moléculaires de régulation communs

Une compilation de la bibliographie permet d'identifier jusqu'à 27 cibles différentes, dont l'interaction avec la S100B est dépendante du calcium (Figure 10). Comme nous l'avons vu ci-dessus, le mécanisme d'interaction est similaire pour toutes ces cibles : la fixation du calcium par la S100B induit un changement drastique de sa conformation, et l'exposition de résidus hydrophobes permet son interaction avec des protéines cibles (Figure 8). Ces différentes cibles peuvent être classées et regroupées de différentes manières : suivant leurs fonctions cellulaires, ou suivant le mécanisme moléculaire par lequel elles sont régulées par la S100B.

Cibles de la S100B	Kd (nM)	Effet de la S100B sur la cible	Kinase inhibée	Références bibliographiques
AHNAK	50			(Gentil et al., 2001)
<u>Aldolase C</u>		Stimulation de l'activité		(Zimmer and Van Eldik, 1986)
Annexin A6	1000	Régulation des flux de calcium et de l'assemblage des IF		(Arcuri et al., 2002; Garbuglia et al., 1998; Garbuglia et al., 2000)
CacyBP/SIP		Régulation de l'ubiquitination		(Filipek et al., 2002; Polyakov et al., 1998)
<u>calcineurin</u>		Stimulation de l'activité		(Leal et al., 2004)
Caldesmon	500	Diminution de l'inhibition de l'actomyosine par la caldesmone		(Filipek et al., 2002; Fujii et al., 1990; Pritchard and Marston, 1991)
Calponine		Diminution de l'inhibition de l'actomyosine par la calponine		(Wills et al., 1993)
CapZ α	150-1000	Régulation de l'assemblage		(Barber et al., 1999; Inman et al., 2002; Ivanenkov et al., 1995; McClintock and Shaw, 2002; McClintock and Shaw, 2003; McClintock et al., 2002; Wear and Cooper, 2004)
Desmin		Régulation de l'assemblage		(Garbuglia et al., 1998)
FtsZ				(Ferguson and Shaw, 2004)
GFAP		Inhibition de la phosphorylation Régulation de l'assemblage	PKC	(Bianchi et al., 1996; Frizzo et al., 2004b; Garbuglia et al., 1998; Ziegler et al., 1998)
<u>Guanylate cyclase membranaire</u>	2000	Stimulation de l'activité		(Duda et al., 1996; Duda and Sharma, 2004; Margulis et al., 1996; Pozdnyakov et al., 1997; Pozdnyakov et al., 1998; Rambotti et al., 1999; Sitaramayya, 2002; Yu et al., 1999)
<i>IF de type III</i>		Régulation de l'assemblage (séquestration des monomères)		(Bianchi et al., 1996; Bianchi et al., 1994; Garbuglia et al., 1996; Sorci et al., 1998)
IQGAP1		Remodelage membranaire		(Mbele et al., 2002)
MAG	7000	Régulation du cytosquelette des cellules gliales		(Kursula et al., 1999)
MARCKS			PKC	(Sheu et al., 1995)
Microtubules		Régulation de l'assemblage (séquestration de la tubuline)		(Donato, 1983; Endo and Hidaka, 1983; Sorci et al., 1998; Sorci et al., 2000)
<u>NDR</u>	500	Modulation de l'activité		(Bhattacharya et al., 2003; Millward et al., 1998; Stegert et al., 2004; Suzuki et al., 2006)
Neurogranin			PKC	(Sheu et al., 1995)
Neuromodulin (GAP-43)		Inhibition de la phosphorylation par la PKC	PKC CKII	(Baudier et al., 1989; Lin et al., 1994; Sheu et al., 1994; Sheu et al., 1995)
P80, similaire à MARCKS				(Pozdnyakov et al., 1998)
p53	24-23 500	Inhibition de la phosphorylation et de l'oligomérisation de p53 Inhibition de la transcription p53 dépendante Régulation de la croissance cellulaire et de l'apoptose.	PKC	(Baudier et al., 1992; Fernandez-Fernandez et al., 2005; Lin et al., 2001; Markowitz et al., 2005; Rustandi et al., 1999; Rustandi et al., 2000; Rustandi et al., 1998; Scotto et al., 1998; Wilder et al., 1998)

<u>Phosphoglucomutase</u>		Stimulation de l'activité		(Landar et al., 1996; Landar et al., 1997)
RAGE		Survie cellulaire		(Adami et al., 2004; Businaro et al., 2006; Hofmann et al., 1999; Huttunen et al., 2000; Reddy et al., 2006; Shaw et al., 2003)
TAU	100-1000	Inhibition de la phosphorylation de TAU par la protéine kinaseII	CaMKII	(Baudier and Cole, 1988; Yu and Fraser, 2001)
<u>Twitchin kinase</u>		Stimulation de l'activité		(Heierhorst et al., 1996)
Vimentine		Inhibe la phosphorylation		(Ziegler et al., 1998)

Figure 10 : Tableau représentant les cibles de la S100B.

Sont représentées en rouge les cibles dont la phosphorylation est inhibée par la S100B, sont soulignées les protéines dont l'activité enzymatique est régulée par la S100B, sont représentées en italique les protéines dont l'oligomérisation est régulée par la S100B.

Parmi ces 27 cibles, une grande majorité, 16, sont des composants ou des régulateurs du cytosquelette : AHNAK, Annexine A6, Caldesmon, Calponine, CapZ α , Desmin, FtsZ, GFAP, IF de type III, IQGAP, MAG, MARCKS, microtubules, p80, Tau, Vimentin (figure 10). Les trois composants majeurs du cytosquelette : microtubules, actine et filaments intermédiaires sont directement régulés, ainsi que de très nombreux composants qui leur sont associés comme les protéines Tau, MARCKS, ou les annexines. Les lieux du remodelage du cytosquelette, pseudopodes, filopodes, cônes de croissance, sont des micro-domaines à concentrations calciques élevées, et la S100B comme senseur du calcium peut s'avérer un outil efficace pour réguler d'une manière dépendante du calcium l'activité des composants du cytosquelette. Un autre groupe de protéines cibles de la S100B comprend les protéines Ndr, PKC et p53, qui sont impliquées dans le contrôle du métabolisme et du cycle cellulaire. Cependant de tels regroupements peuvent paraître artificiels, en effet quoi de commun entre une protéine architecturale, la tubuline, une kinase, Ndr, et un facteur de transcription, p53 ? Les conséquences sur les protéines cibles peuvent se classer en trois catégories: inhibition de la phosphorylation, inhibition de la formation d'oligomères par séquestration des monomères, ou régulation de l'activité enzymatique. Ces groupes peuvent se recouvrir, ainsi la régulation de la phosphorylation des protéines GFAP ou p53 régule également leurs oligomérisations, la régulation de la phosphorylation de la protéine NDR régule son activité kinase. Parmi les 28 cibles de la S100B identifiées, il a été montré pour 12 d'entre elles que la fixation de la S100B inhibe leur phosphorylation (figure 10). Ce mécanisme permet de relier le niveau de phosphorylation des protéines aux concentrations cytosoliques calciques locales. Sont inhibées par la S100B des phosphorylations induites par : la caséine kinase 2, la CDK2, la PKC. Au moins cinq cas sont décrits pour cette dernière kinase. L'explication moléculaire est

simple, il existe une forte identité entre certains sites de fixation de la S100B, et le site consensus de phosphorylation par la PKC. La fixation de la S100B masque ce site consensus et empêche ainsi sa phosphorylation par la protéine kinase. La régulation conjointe du même site de phosphorylation par la pKC et la S100B, est supportée par la co-expression et la co-localisation de ces deux protéines in vivo (Lefranc et al., 2005). D'autre part, dans une culture cellulaire de cardiomyocytes, la surexpression de la S100B inhibe l'induction PKC- β dépendant de l'expression de l' α -actine et de la β -myosine. Cependant dans ce dernier cas les cibles moléculaires de la PKC et de la S100B ne sont pas identifiées.

Les S100A1 et S100B partagent des protéines cibles

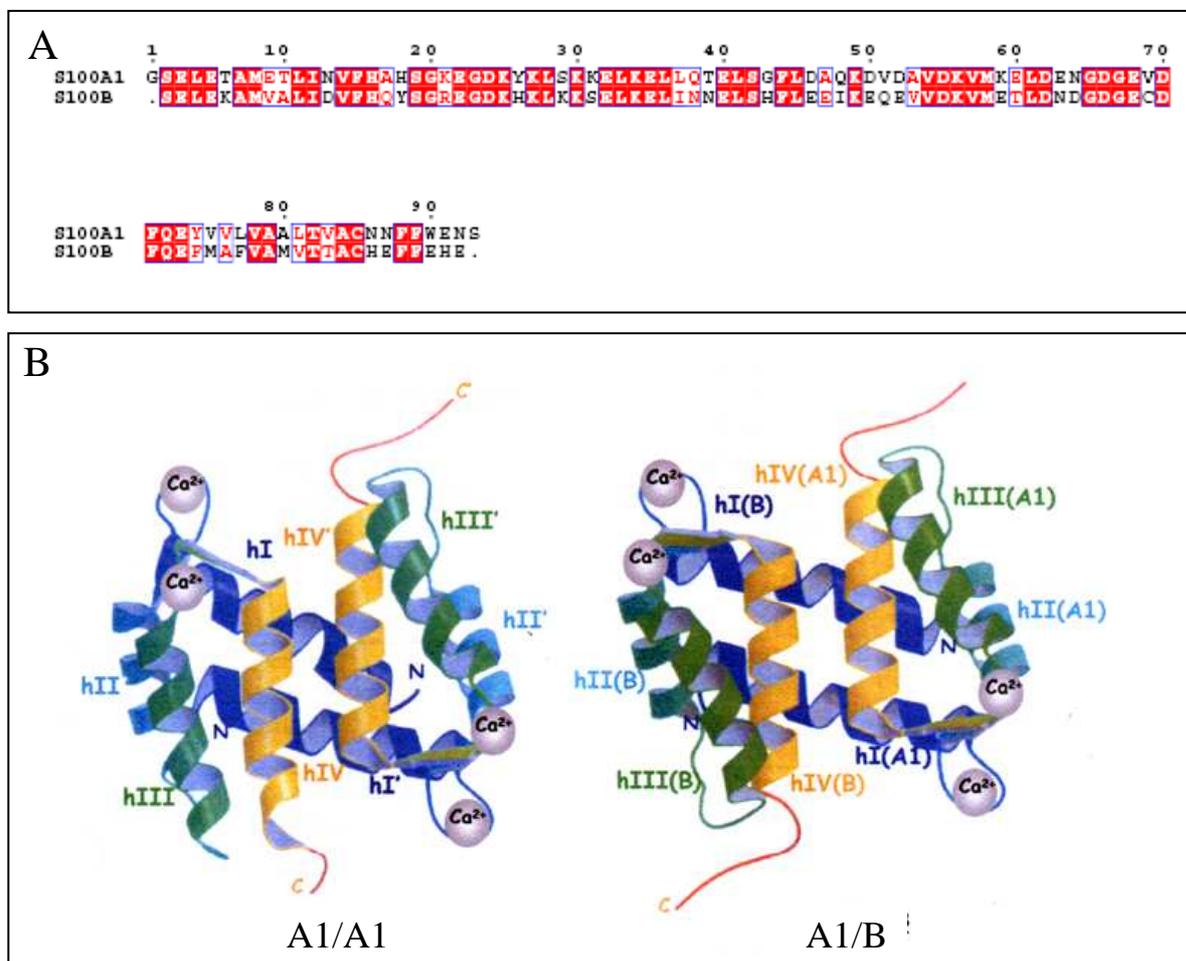


Figure 11 : S100A1 et S100B : deux protéines fortement homologues.

(A)Alignement des séquences des protéines S100A1 et S100B humaines. S100A1 et S100B possèdent 59 % d'identité.

(B) Comparaison de la structure tertiaire d'un homo-dimère S100A1/S100A1 avec un hétéro-dimère S100A1/S100B. La conformation des hétéro-dimères est très proche des homo-dimères (d'après Rustandi et al., 2002).

La S100B et la S100A1, qui présentent 59 % d'identité de séquence et peuvent former des hétérodimères (figure 11), partagent de nombreuses cibles : la Twitchin kinase (Heierhorst, 1996), la guanilate cyclase (Duda et al., 1996; Margulis et al., 1996; Pozdnyakov et al., 1997; Pozdnyakov et al., 1998; Rambotti et al., 1999), le récepteur RAGE (Hofmann et al., 1999; Huttunen et al., 2000), l'annexine A6 (Arcuri et al., 2002; Garbuglia et al., 1998), le suppresseur de tumeur p53 (Fernandez-Fernandez et al., 2005; Rustandi et al., 2000), la protéine d'ubiquitination CacyBP/SIP (Calcyclin-binding protein/Siah-1- interacting protein) (Filipek et al., 2002; Polyakov et al., 1998), les microtubules (Donato, 1988; Donato et al., 1985; Sorci et al., 1998), les filaments intermédiaires de type III (Bianchi et al., 1993; Bianchi et al., 1994; Garbuglia et al., 1996), la protéine CapZ α (Ivanenkov et al., 1996; Ivanenkov et al., 1995), et la protéine Tau (Baudier and Cole, 1988; Baudier et al., 1987). Dans ces nombreux cas, l'effet de la S100A1 ou de la S100B sur la cible est identique. Il existe une seule exception, la phosphoglucomutase (Landar et al., 1996). Dans ce dernier exemple, la S100A1 inhibe tandis que la S100B stimule l'activité de cette enzyme.

A cette exception près, connaissant le fort recouvrement des profils d'expressions de ces deux protéines, associé à leur capacité à former des hétérodimères (figure 11), il est important de noter que lors d'approches génétiques visant à moduler l'expression de l'une ou l'autre de ces protéines, la seconde pourrait tout à fait compenser la première.

Au vu du grand nombre de cibles (figure 10), la S100B ne se réduit pas à une fonction unique, mais sa fonction dépend de l'activité des cibles qu'elle régule. La S100B est un module, un senseur à calcium, sélectionné plusieurs fois au cours de l'évolution pour réguler de façon fine et calcium dépendante des fonctions diverses. Le grand défi reste l'intégration de toutes ces fonctions au niveau cellulaire et au niveau de l'organisme. De façon logique, la surexpression ou l'inactivation de la S100B, que ce soit au niveau cellulaire ou au niveau de l'organisme, ne présente pas de phénotype fort mais des phénotypes complexes.

Le chapitre suivant tente d'intégrer dans différents types cellulaires, les fonctions de la S100B. Sont regroupés aussi bien des approches en culture cellulaire que des phénotypes observés sur des souris génétiquement modifiées. Il est important de noter que deux lignées transgéniques et deux lignées invalidées pour la S100B ont été créées, et qu'elles sont toutes viables et ne présentent pas de phénotypes majeurs.

Fonction de la S100B dans les astrocytes

Cycle cellulaire, S100B extracellulaire, activité autocrine.

A confluence, l'augmentation de l'expression de la S100B dans les cellules C6, lignée issue d'un astrocytome, corrèle avec l'inhibition de contact et une sensibilité accrue à l'apoptose induite par les UV (Labourdette et al., 1977; Scotto et al., 1998). L'invalidation par une approche anti-sens de la S100B dans les cellules gliales s'accompagne d'une altération du cycle cellulaire (Selinfreund et al., 1990). Des expériences montrent que cet effet résulte de l'action autocrine de la S100B sécrétée qui à des concentrations extracellulaires de l'ordre du nM stimule la prolifération des astrocytes (Goncalves et al., 2000; Scotto et al., 1998; Selinfreund et al., 1991; Tramontina et al., 2006). La S100B est sécrétée par les astrocytes (Gerlach et al., 2006; Shashoua et al., 1984; Tramontina et al., 2006), et cette sécrétion n'est pas véhiculée par les voies classiques (Barger and Van Eldik, 1992; Rammes et al., 1997). Suite à l'activation du récepteur RAGE par la S100B extra-cellulaire, ERK1/2 est activé en aval de cette voie (Goncalves et al., 2000). Les effets trophiques ou toxiques de la S100B dépendent de ses concentrations extracellulaires (Figure 12).

Dans les cellules astrogliales la sécrétion de S100B peut être stimulée par l'application de sérotonine dont l'action passe par le récepteur 5-HT1A (Whitaker-Azmitia and Azmitia, 1989; Whitaker-Azmitia et al., 1990). La sécrétion de S100B par les astrocytes est également importante lors de stress métaboliques (Gerlach et al., 2006). Elle peut-être induite par le glutamate, et semble dépendre partiellement du transporteur à glutamate (Tramontina et al., 2006). En accord avec sa sécrétion lors de stress, les patients atteints d'épilepsie, du syndrome de Down (Griffin et al., 1989), ou de la maladie d'Alzheimer (Griffin et al., 1989; Marshak et al., 1992; Mrak and Griffinbc, 2001; Sheng et al., 1996) présentent des concentrations élevées de S100B extracellulaires. D'autre part, les concentrations de S100B augmentent dans le sérum après des chirurgies cardiaques, lors d'infarctus cardiaque, lors de traumatismes crâniens, ou lors de la maladie de Creutzfeldt-Jakob.

S100B et régulation du cytosquelette

L'invalidation anti-sens de la S100B dans les cellules gliales s'accompagne d'une altération de l'organisation du cytosquelette et de la morphologie cellulaire (Selinfreund et al., 1990). La S100B régule le remodelage du cytosquelette cAMP dépendant des astrocytes (Frizzo et al., 2004a). Dans les cellules GL15, issues d'un astrogliome, l'invalidation de la S100B par siRNA réduit la prolifération et induit un changement morphologique, la stellation (Brozzi F., 2006).

Enfin, une astrocytose est associée à la surexpression de S100B dans l'hippocampe dans un modèle de souris transgéniques (Reeves et al., 1994). L'astrocytose induite par les lésions du SNC se caractérise par une hypertrophie et une sur-expression du filament intermédiaire GFAP dans les prolongements cellulaires. La GFAP qui, par ailleurs, a été identifiée *in vitro* comme une cible de la S100B (Figure 13). Mais là encore *in vivo* il n'existe qu'une corrélation pour l'expression de ces deux protéines et l'importance fonctionnelle d'une telle interaction n'a pas été montrée.

Cependant la difficulté des études chez les astrocytes est la distinction du pool intracellulaire du pool extracellulaire de S100B. En effet les astrocytes sécrètent la S100B, et des approches telles que l'inactivation par siRNA ou la surexpression perturbent à la fois la production de S100B intracellulaire et sécrétée. Les modifications morphologiques observées peuvent donc aussi bien résulter d'une perturbation directe des fonctions intracellulaires de la S100B, que de l'effet autocrine de la S100B sécrétée.

S100B et régulation de l'homéostasie calcique

L'homéostasie calcique est également perturbée dans les astrocytes de souris invalidées pour la S100B (Xiong et al., 2000). Suite à leur stimulation, une augmentation de l'amplitude et de la durée des « transients » calciques est observée par rapport aux souris contrôles. Ce résultat suggère que l'expression de la S100B permet aux cellules de mieux tamponner les augmentations calciques (figure 13). Comme explicité ci-dessus l'affinité de la S100B pour le calcium est trop faible pour que la S100B puisse directement tamponner le calcium cytosolique. La S100B ne peut être un senseur à calcium que dans les micro-domaines à fortes concentrations calciques locales et transitoires, interfaces RE-mitochondrie, cluster de canaux calciques à la membrane plasmique, interfaces où la S100B régule probablement de façon calcium dépendante un autre composant de l'homéostasie calcique.

Fonction de la S100B dans et sur les Neurones

Effets neurotrophiques et neurotoxiques de la S100B sécrétée par les astrocytes

Dans le gyrus dentelé de rat, une augmentation de l'expression de la S100B dans les astrocytes a été observée au moment de la formation des synapses (McAdory et al., 1998). Suite à une lésion de l'hippocampe, lorsque des cellules C6, lignée issue d'un gliome, sont greffées, exprimant ou n'exprimant pas la S100B, seules les cellules exprimant la S100B sont pénétrées par les fibres neurales (Ueda et al., 1995). Le rôle neurotrophique de la S100B sécrétée par ces astrocytes a été validé par d'autres expériences. L'application de S100B à des

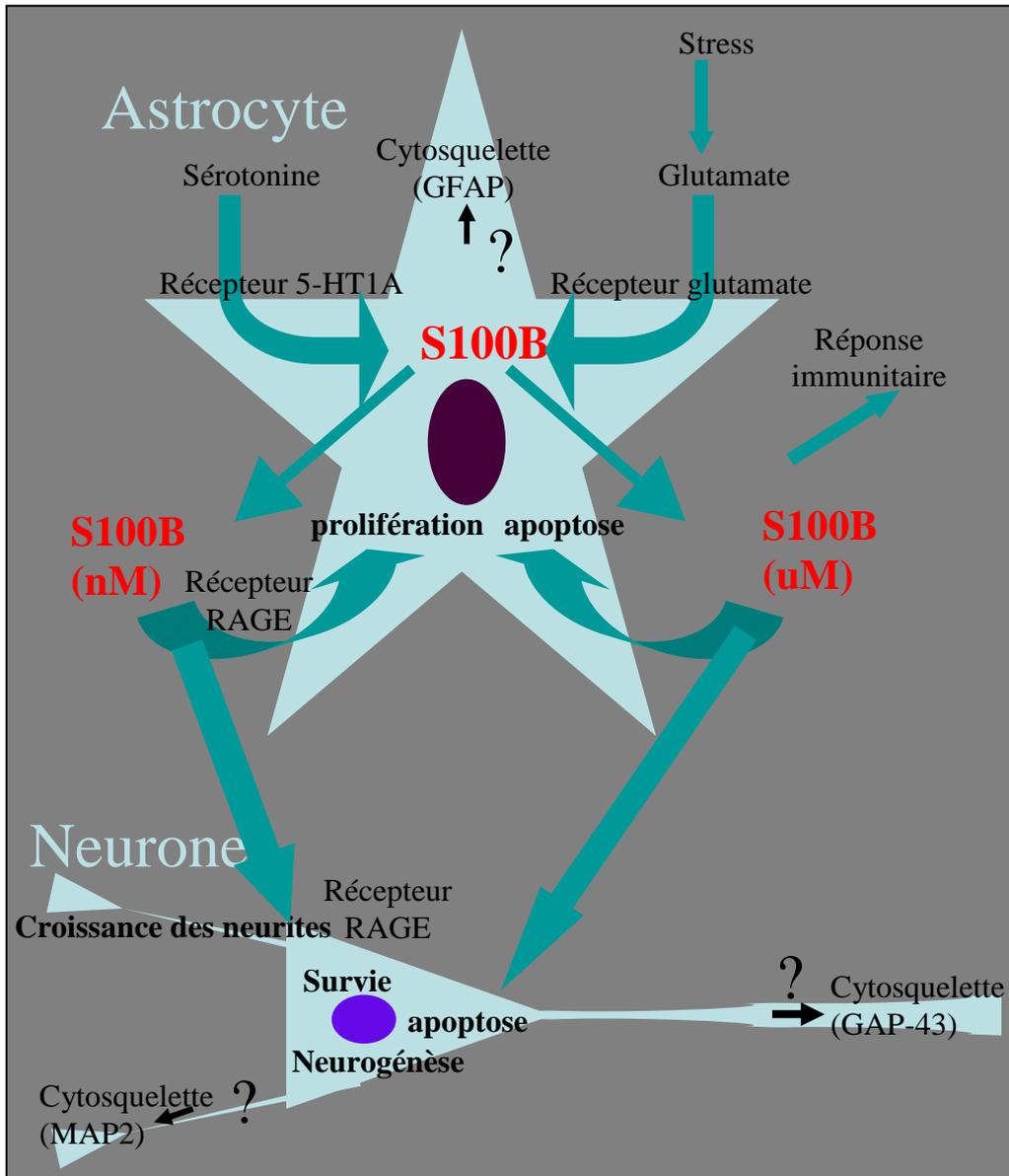


Figure 12 : Fonction de la S100B dans les neurones et les astrocytes.

Dans le système nerveux central, la S100B est sécrétée par les astrocytes, et cette sécrétion est notamment stimulée dans des situations de stress. Elle peut être stimulée par l'application de sérotonine ou de glutamate, dont les effets passent par le récepteur 5-HT1A et le récepteur au glutamate respectivement. A des concentrations de l'ordre du nM, la S100B extracellulaire stimule la prolifération des astrocytes, et dans les neurones la survie, la neurogénèse, et la croissance des neurites; à des concentrations de l'ordre du mM, au contraire, elle favorise l'apoptose des neurones et des astrocytes.

Dans ces deux types cellulaires la perturbation de l'expression de la S100B s'accompagne d'une modification du cytosquelette, notamment de la GFAP dans les astrocytes, de GAP-43 et MAP2 dans les neurones. Mais ces effets peuvent aussi bien résulter indirectement d'une perturbation de la S100B extracellulaire que d'une modification directe des fonctions intracellulaires de la S100B.

concentrations de l'ordre du nanomolaire favorise la survie des neurones (Businaro et al., 2006; Ueda et al., 1995; Whitaker-Azmitia et al., 1990), stimule la croissance des neurites (Kligman and Hsieh, 1987; Winningham-Major et al., 1989) et la neurogénèse, notamment après l'exposition à différents stress ou traumatismes, et augmente ainsi la restauration des capacités cognitives (Kleindienst et al., 2005). Enfin, l'oxydation de la S100B extracellulaire qui aboutit à la formation de ponts disulfures pourrait augmenter ses effets neurotrophiques (Barger and Van Eldik, 1992). Au contraire, à des concentrations de l'ordre du micromolaire, la S100B extracellulaire a des effets délétaires, et favorise notamment la mort neuronale (Fulle et al., 2000; Mariggio et al., 1994) (figure 12).

Dans les neurones, les effets de la S100B extracellulaire passent par le récepteur RAGE (Businaro et al., 2006; Huttunen et al., 2000) (figure 12). La structure rayon X d'une telle interaction a récemment été obtenue (Koch M., 2006). L'activation du facteur de transcription NF-KB composé de p65/c-Rel (Kogel et al., 2004; Lam et al., 2001) qui aboutit à la surexpression de BCL2 (Huttunen et al., 2000), est en aval de l'activation du récepteur RAGE par la S100B.

Comparées aux souris sauvages, les souris transgéniques surexprimant la S100B présentent plus de neurites, la densité de dendrites et le marquage MAP-2 sont plus élevés chez les jeunes souris. Mais cette tendance est inversée avec l'âge, à un an une perte de dendrites significative est observée (Shapiro et al., 2004; Shapiro and Whitaker-Azmitia, 2004; Whitaker-Azmitia et al., 1997). Ces phénotypes pourraient s'expliquer par les effets neurotoxiques ou neurotrophiques de la S100B extracellulaire sécrétée par les astrocytes qui sont perturbés dans les souris transgéniques.

S100B intracellulaire

Dans le gyrus dentelé de rat, une augmentation de S100B a été observée au moment de la formation des synapses dans les astrocytes, mais également dans les compartiments pré- et post-synaptiques des neurones (McAdory et al., 1998). Cette observation indique qu'une part des phénotypes neuraux observés chez les souris transgéniques pour la S100B pourrait résulter de la perturbation de la fonction intracellulaire de la S100B (figure 13). Dans les neurones, l'analyse des composants du cytosquelette montre un vieillissement accéléré chez les souris transgéniques pour la S100B (Whitaker-Azmitia et al., 1997), notamment pour MAP-2 et GAP-43 (Neuromoduline) (Shapiro and Whitaker-Azmitia, 2004). Or, in vitro, la S100B inhibe la phosphorylation PKC dépendante de GAP-43 (Neuromoduline) (Baudier et al., 1989; Lin et al., 1994; Sheu et al., 1994; Sheu et al., 1995), phosphorylation de GAP-43

qui est critique dans la régulation morphologique du bouton synaptique et de la LTP (Benowitz and Routtenberg, 1997). Cette même LTP est perturbée aussi bien chez les souris transgéniques que chez les souris KO pour la S100B. Cependant aucune co-localisation entre S100B et GAP-43 n'a été présentée à ce jour, et la modification du pattern de GAP-43 dans les souris transgéniques peut n'être qu'une conséquence secondaire.

Enfin, dans les cellules PC12 la surexpression intracellulaire de la S100B promeut la prolifération et inhibe la différenciation induite par le NGF via l'activation de la voie Akt-p21^{WAF1}-cdk4-Rb (Arcuri et al., 2005). Cependant ce tout dernier résultat est à interpréter avec précaution, les cellules PC12 n'expriment pas de S100B endogènes, les conditions expérimentales sont donc fortement différentes des conditions physiologiques.

Fonction de la S100B dans les cellules musculaires

Dans les cellules musculaires différenciées, l'application sur du réticulum sarcoplasmique d'un mélange de S100A1 et de S100B, composé de 20% de S100A1 et de 80% de S100B, stimule la libération de calcium (Marsili et al., 1992) (figure 13). D'autre part, la S100B intracellulaire est fortement exprimée dans les myoblastes, cellules précurseurs des cellules musculaires (Sorci et al., 1999). La surexpression inhibe la différenciation tandis que son invalidation promeut la prolifération cellulaire (Tubaro C., 2006).

Au contraire, l'application de S100B extracellulaire stimule la prolifération et inhibe la différenciation des myoblastes par une stimulation de ERK1/2 et une inhibition p38 MAPK, indépendamment de la voie du récepteur RAGE (Riuzzi F., 2006; Sorci et al., 2003). Dans les cellules musculaires lisses du système vasculaire, l'application de S100B extracellulaire et sa fixation sur le récepteur RAGE induisent l'activation de la tyrosine kinase Src et en aval de celle-ci, l'activation de NF-KB et STAT3, la production de superoxyde, la phosphorylation de Cav-1, la migration des cellules et l'expression de gènes pro-inflammatoires (Reddy et al., 2006).

L'expression de S100B est induite dans les cardiomyocytes de sujets souffrant d'infarctus du myocarde (Parker et al., 1998). Le modèle d'infarctus chez le rat, induit par la ligation temporaire de l'artère coronaire, permet une étude plus fine de la cinétique d'expression de la S100B. Les myocytes qui survivent passent par une phase transitoire d'hypertrophie compensatoire associée à la ré-expression de gènes fœtaux : facteur atrial natriurétique, chaîne lourde de la β -myosine, α -actine squelettique. La surexpression de la S100B n'est qu'ultérieure à ce phénomène, survient 7 jours post infarctus et persiste pendant 28 jours, et

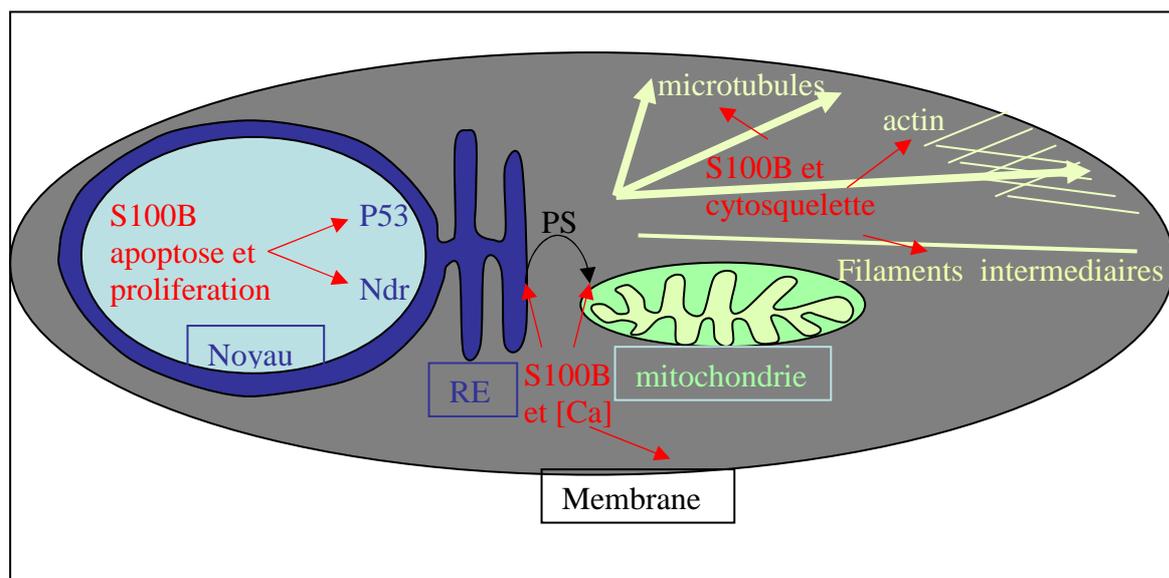


Figure 13 : Fonctions intracellulaires de la S100B

(A) Cytosquelette. Il a été montré dans les astrocytes et les neurones que la S100B contrôle la morphologie des cellules. Par ailleurs *in vitro* la S100B interagit avec les trois composants majeurs du cytosquelette (Figure 9): les microtubules, les filaments intermédiaires, et l'actine ; mais interagit également avec de nombreux de leurs interactants comme les protéines Tau, Map2 ou CapZ. Mais un lien direct entre la morphologie dépendant de la S100B, et son interaction avec des cibles cytosoliques n'a jamais été montré.

(B) Signalisation calcique et transfert de PS. Dans les astrocytes l'inactivation de l'expression inhibe la signalisation calcique cytosolique (Xiong et al., 2000). Il a été proposé que la S100B régule via une cible un des stocks calciques : RE, mitochondrie, ou membrane plasmique. Dans les cellules CHO la S100B régule le transfert de PS entre le RE et les mitochondries qui est lui-même dépendant des transferts de calcium (Kuge et al., 2001).

(C) Cycle cellulaire et apoptose. Dans les mélanomes, la surexpression de la S100B interagit avec p53 et inhibe son expression, ses fonctions transcriptionnelles et apoptotiques. S100B pourrait également perturber l'activité de la kinase Ndr.

coïncide au retour à un phénotype normal et à l'inhibition des gènes fœtaux (Tsoporis et al., 1997). Chez les souris transgéniques qui surexpriment la S100B, la phase d'hypertrophie compensatoire n'a pas lieu et une apoptose accrue est observée (Parker et al., 1998). Au contraire, chez les souris invalidées pour la S100B, cette hypertrophie est accrue, et l'apoptose diminue (Tsoporis et al., 2005). Bien que de nombreuses cibles de la S100B soient connues, facteurs de transcription ou composants du cytosquelette par exemple, le mécanisme moléculaire par lequel la S100B contrôle le remodelage morphologique des cardiomyocytes lors des infarctus reste inconnu.

Différenciation cellulaire des Oligodendrocytes

Dans le lignage oligodendrocytaire, l'expression de la S100B corrèle avec la différenciation (Deloulme et al., 2004; Hachem et al., 2005), et module la maturation des cellules progénitrices oligodendrogiales (CPO) (Deloulme et al., 2004). Si au final les souris invalidées pour la S100B ne présentent pas de défaut majeur concernant l'oligodendrogénèse, la maturation de ces cellules semble retardée (Deloulme et al., 2004).

Mélanomes, p53, Ndr, et S100B, plus qu'une simple corrélation

Dans les mélanomes malins, l'expression élevée de S100B corrèle avec la récurrence de la maladie et son potentiel métastatique (Banfalvi et al., 2003; Bonfrer and Korse, 2001; Boni et al., 1997; Eckert et al., 2004; Harpio and Einarsson, 2004; Park and Min, 2003). L'inhibition de la S100B dans les mélanomes malins restaure l'expression de p53 et ses fonctions transcriptionnelles et apoptotiques (Lin et al., 2001; Lin et al., 2004; Markowitz et al., 2004; Markowitz et al., 2005). Cet effet de la S100B résulte de la capacité de la S100B à interagir avec p53 dont elle inhibe la phosphorylation (Baudier et al., 1992) et l'oligomérisation (Fernandez-Fernandez et al., 2005) et promeut ainsi sa dégradation. Ces études sont d'un intérêt tout particulier car il s'agit des rares études où la fonction de la S100B est intégrée du niveau moléculaire au niveau cellulaire (figure 13).

D'autre part dans les lignées de mélanome qui surexpriment la S100B, l'activité de la protéine kinase Ndr est élevée et cette activité dépend de son interaction avec la S100B (Millward et al., 1998). Cette interaction pourrait également participer à la transformation cellulaire, puisque l'activité Ndr est directement impliquée dans la régulation du cycle cellulaire (Tamaskovic et al., 2003).

(A) Inactivation (KO) de la S100B

Xiong et al., 2000:

Fond génétique: CD1

Phénotype: augmentation de la durée et de l'amplitude des "transients" calciques dans les astrocytes (Xiong et al., 2000), de la sensibilité à un protocole d'épilepsie provoquée (Dyck et al., 2002), retard de la différenciation des cellules progénitrices oligodendrogiales (Deloulme et al., 2004), hypertrophie accrue lors des infarctus cardiaques (Tsoporis et al., 2005).



Nishiyama et al., 2002:

Fond génétique: C57BL/6J

Phénotype: meilleure aptitude à l'exploration spatiale, et un renforcement de la LTP (Nishiyama et al., 2002).



(B) Surexpression de la S100B

Friend et al., 1992:

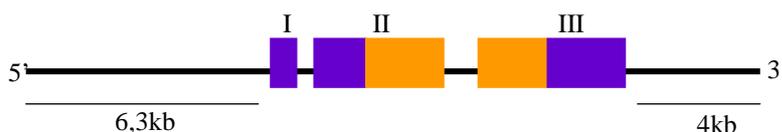
Fond génétique: CD1

Transgène: 17,3 kb (Allore et al., 1990)

Nombre de copies du transgène: 8 à 110

Surexpression de la S100B: 10 à 100 fois

Phénotype: Absence d'hypertrophie cardiaque lors de l'ischémie cardiaque (Parker et al., 1998). Augmentation de la densité de dendrites et du marquage MAP-2 à la naissance. Tendance inversée avec l'âge, à un an. Vieillesse accélérée du cytosquelette (MAP-2 et GAP-43) dans les neurones, (Shapiro and Whitaker-Azmitia, 2004; Whitaker-Azmitia et al., 1997). Hyperactivité induite par la nouveauté chez les femelles (Gerlai et al., 1993), diminution des capacités à résoudre des problèmes spatiaux, capacités d'exploration altérées (Gerlai et al., 1994; Gerlai et al., 1995; Roder et al., 1996a; Roder et al., 1996b; Whitaker-Azmitia et al., 1997), diminution de 25% de la LTP dans l'hippocampe (Long Term Potentiation).



Reeves et al., 1994:

Fond génétique: C57BL/6J

Transgène: 8,9 kB (Jiang et al., 1993)

Nombre de copies du transgène: 2 à 12

Surexpression de la S100B: 3 à 7 fois

Phénotype: astrocytose.

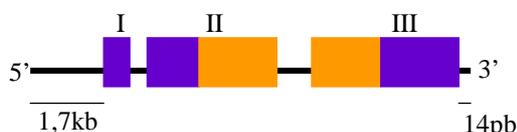


Figure 14: Modèles de souris invalidées et transgéniques pour la S100B.

Aucun phénotype majeur n'est observé. Seuls sont observés : des phénotypes subtils de comportement, ou des phénotypes révélés par une situation de stress : vieillissement, ischémie, épilepsie. Aucun de ces phénotypes n'a été confirmé dans deux modèles génétiques différents.

Etude de la S100B dans les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary Cells)

Lors d'un fractionnement biochimique dans les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary Cells), la S100B a été isolée comme le facteur cytosolique qui stimule le transfert de

phosphatidylserine du réticulum endoplasmique vers les mitochondries. Ce résultat a été confirmé par l'application de S100B recombinante sur des cellules perméabilisées : le transport de PS est également stimulé. La stimulation de ce transport par la S100B dépend de l'ajout d'ATP, et nécessite de fortes concentrations calciques : 0.5 mM. Si le mécanisme moléculaire d'action de la S100B est une interaction dépendante du calcium avec une cible, cette cible doit être localisée à l'interface entre les mitochondries et le RE, seul endroit où de telles concentrations calciques sont atteintes (Csordas et al., 1999; Neher, 1998). Il a ainsi été proposé que la S100B soit le senseur à calcium qui régule l'interaction entre le RE et les mitochondries (Vance and Steenbergen, 2005), dont il a par ailleurs été montré que l'interaction est dépendante du calcium (Wang et al., 2000b).

Cette dernière observation permet de souligner la grande limite de toutes ces études. Un lien direct est très rarement établi entre : toutes ces cibles calcium dépendantes de la S100B identifiées *in vitro* d'une part, et les phénotypes S100B dépendants observés au niveau cellulaire ou au niveau de l'organisme d'autre part. L'importance fonctionnelle de l'interaction de la S100B avec ces cibles n'a que rarement véritablement été validée *in vivo*.

S100B transgénique, KO et cognition

Phénotype

Les souris transgéniques pour la S100B présentent plusieurs troubles comportementaux : une hyperactivité induite par la nouveauté chez les femelles (Gerlai et al., 1993), une diminution des capacités à résoudre des problèmes spatiaux, et des capacités d'exploration altérées (Gerlai et al., 1994; Gerlai et al., 1995; Roder et al., 1996a; Roder et al., 1996b; Whitaker-Azmitia et al., 1997). Ces résultats sont associés à une diminution de 25% de la LTP (Long Term Potentiation) dans l'hippocampe. La LTP, qui correspond à une facilitation et un renforcement de la transmission synaptique lors de la stimulation répétée et intense d'un réseau neuronal, joue un rôle essentiel dans les phénomènes d'apprentissage et de mémorisation. Les troubles comportementaux et cognitifs observés chez les souris transgéniques pour la S100B résultent donc probablement de cette perturbation de la LTP.

En accord avec ces résultats, l'importance du rôle de la S100B dans le phénomène de la LTP est soutenue par le phénotype observé chez les souris invalidées pour la S100B qui est opposé à celui observé chez les souris transgéniques. Les souris invalidées pour la S100B sont viables, fertiles, présentent une meilleure aptitude à l'exploration spatiale, et un renforcement de la LTP (Nishiyama et al., 2002). D'autre part, soumises à un protocole d'épilepsie

provoquée, ces souris sont plus sensibles et développent des symptômes plus sévères que les souris sauvages (Dyck et al., 2002).

Rôle de la S100B sécrétée dans la cognition

L'étude de l'implication de la S100B extracellulaire dans les phénomènes de LTP est ancienne, mais aux premiers abords ces résultats semblent contradictoires avec ceux plus récemment observés sur les souris transgéniques et invalidées.

L'application de sérum anti S100 bloque la LTP dans des tranches d'hippocampe (Lewis, 1986), contrairement aux souris invalidées pour la S100B pour lesquelles la LTP est renforcée (Roder et al., 1996a). Le rôle de la S100B se trouverait en amont de la production d'AMPC (Rebaudo et al., 2000). Connaissant l'importance de la LTP dans l'hippocampe lors des phénomènes de mémorisation, l'inhibition de la LTP est fort probablement à l'origine de l'amnésie observée quand le sérum est injecté à des oiseaux (O'Dowd et al., 1997) ou dans les ventricules de rats (Hyden and Lange, 1970).

L'infusion de S100B semble au contraire renforcer la mémorisation (Mello e Souza et al., 2000) et favorise la restauration des capacités cognitives après une lésion cérébrale (Kleindienst et al., 2005). Dans ce dernier cas, une neurogénèse accrue a été observée.

Mais en parfaite contradiction avec les résultats ci-dessus, le renforcement de la LTP observée chez les souris S100B KO peut-être aboli par la perfusion de S100B recombinante (Nishiyama et al., 2002).

Ces résultats contradictoires en apparence pourraient être réconciliés : l'effet neurotoxique ou neurotrophique de la S100B extracellulaire dépend des concentrations appliquées comme présenté dans les paragraphes ci-dessus. Les effets observés lors des manipulations des concentrations extracellulaires de S100B peuvent être complètement différents de la fonction réelle de la S100B à des concentrations physiologiques.

Enfin la modification des capacités cognitives des souris KO et transgéniques pour S100B peut également avoir pour origine les fonctions intracellulaires de la S100B. Nous avons vu précédemment que celle-ci peut modifier le cytosquelette ou l'homéostasie calcique des astrocytes ou des neurones, or le cytosquelette et l'homéostasie calcique sont deux composantes essentielles de la plasticité synaptique et de la LTP.

Pathologie mentale de la maladie d'Alzheimer

Chez les malades atteints de la trisomie 21, la surexpression de S100B dans les astrocytes et la microglie semble corrélérer avec la formation des plaques amyloïdes dans le cerveau (Stanley et al., 1994). De même, dans le cerveau de personnes souffrant de la maladie d'Alzheimer, chez

lesquelles se forment également des plaques amyloïdes, une surexpression de la S100B intracellulaire est observée dans les astrocytes, ainsi qu'une augmentation de la S100B sécrétée. Sur une culture cellulaire, de la lignée LAN-5 issue d'un neuroblastome, l'application de S100B extracellulaire à des concentrations de l'ordre du nM protège contre l'effet neurotoxique du peptide β -amyloïde, cet effet passe par le récepteur RAGE. En revanche à des concentrations de l'ordre du mM, la S100B s'avère toxique (Businaro et al., 2006).

Toujours chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, le nombre d'astrocytes activés surexprimant la S100B en périphérie des plaques séniles (Sheng et al., 1994) est proportionnel à celui des neurites dystrophiques (Mrak et al., 1996). D'autre part ces neurites dystrophiques hypertrophiés sont enrichis dans des zones contenant une protéine Tau hyper phosphorylée. *In vitro*, la S100B régule la phosphorylation de la protéine Tau, en revanche la S100B est incapable d'interagir avec la protéine Tau hyperphosphorylée (Yu and Fraser, 2001). Mais *in vivo* il n'existe que des corrélations entre hyper phosphorylation de Tau et son accumulation extracellulaire, surexpression de la S100B, et développement de neurites hypertrophiées. L'importance fonctionnelle des interactions entre Tau et S100B, les raisons et les conséquences de leur perturbation dans la maladie d'Alzheimer, restent à démontrer. Encore une fois, si des corrélations entre l'expression de la S100B et des modifications fonctionnelles de ses cibles existent *in vivo*, l'importance fonctionnelle de cette interaction reste incomprise. Par ailleurs, la protéine S100B peut protéger les cellules contre le stress oxydant en séquestrant le Cu^{2+} (Nishikawa et al., 1997). Pour mémoire, le Cu^{2+} est en effet réduit par la β -Amyloïde 4 en Cu^+ et conduit au développement de la maladie d'Alzheimer (Multhaup et al., 1996). D'autre part la S100B peut également fixer les ions aluminium. Cette observation pourrait impliquer la S100B dans la physiopathologie des maladies neurodégénératives, quand on sait que l'aluminium peut déclencher des pathologies telles que la maladie d'Alzheimer (Campbell, 2002).

De nombreuses causes peuvent être à l'origine de la dérégulation de l'expression de la S100B. De même, connaissant le nombre de cibles de la S100B, de nombreuses conséquences peuvent lui être attribuées. Mais tout ne reste qu'à l'état d'hypothèses. La pathologie d'Alzheimer est un exemple caractéristique qui permet d'illustrer la difficulté d'intégrer la fonction de la S100B au niveau de l'organisme. D'une part, il est difficile de discriminer le rôle de deux populations de S100B différentes, intracellulaires et sécrétées, d'autre part il est également difficile d'établir un lien de cause à effet entre la dérégulation d'expression de la

S100B et le dysfonctionnement d'une de ses nombreuses cibles alors que cette interaction n'a été démontrée qu'*in vitro*.

Si l'intégration fonctionnelle au niveau cellulaire de toutes les cibles moléculaires de la S100B s'avère complexe, leur intégration au niveau de la physiologie de l'organisme est encore plus difficile. Les souris transgéniques et les souris KO sont viables, et sans défauts majeurs apparents. D'autre part, les phénotypes subtils et complexes comme : une faible modification des capacités cognitives, une sensibilité accrue à l'épilepsie, une diminution de l'hypertrophie cardiaque lors d'infarctus induits, le vieillissement accéléré du cytosquelette dans les neurones, n'ont été observés que dans une seule lignée génétiquement modifiée malgré les deux lignées invalidées et les deux lignées transgéniques qui existent. Ces phénotypes qui dépendent du fond génétique ou du lieu d'insertion du transgène doivent donc être interprétés avec précaution.

Deux explications peuvent être trouvées à cette absence de phénotype fort. Tout d'abord, la famille des S100 est grande, la S100B partage de nombreuses cibles communes avec la S100A1, ainsi qu'un patron d'expression similaire. Au cours du développement se mettent donc probablement en place des phénomènes de compensation. Ensuite, la famille des S100 apparaît tard au cours de l'évolution, chez les vertébrés, les S100 ne sont donc pas indispensables au fonctionnement d'organismes multicellulaires complexes et pourraient ne participer qu'à la robustesse du système. Cependant les S100, de par leur rôle régulateur deviennent peut-être essentielles dans des conditions environnementales particulières, notamment de stress comme les traumatismes neuraux, l'infarctus, l'épilepsie ou le vieillissement. Les origines des phénotypes subtils observés peuvent être aussi multiples que le nombre de cibles de la S100B identifiées au niveau moléculaire.

Le réseau mitochondrial

Mitochondries : hétérogénéité de distribution, de déplacement, et de morphologie pour une spécialisation fonctionnelle

Variation intercellulaire

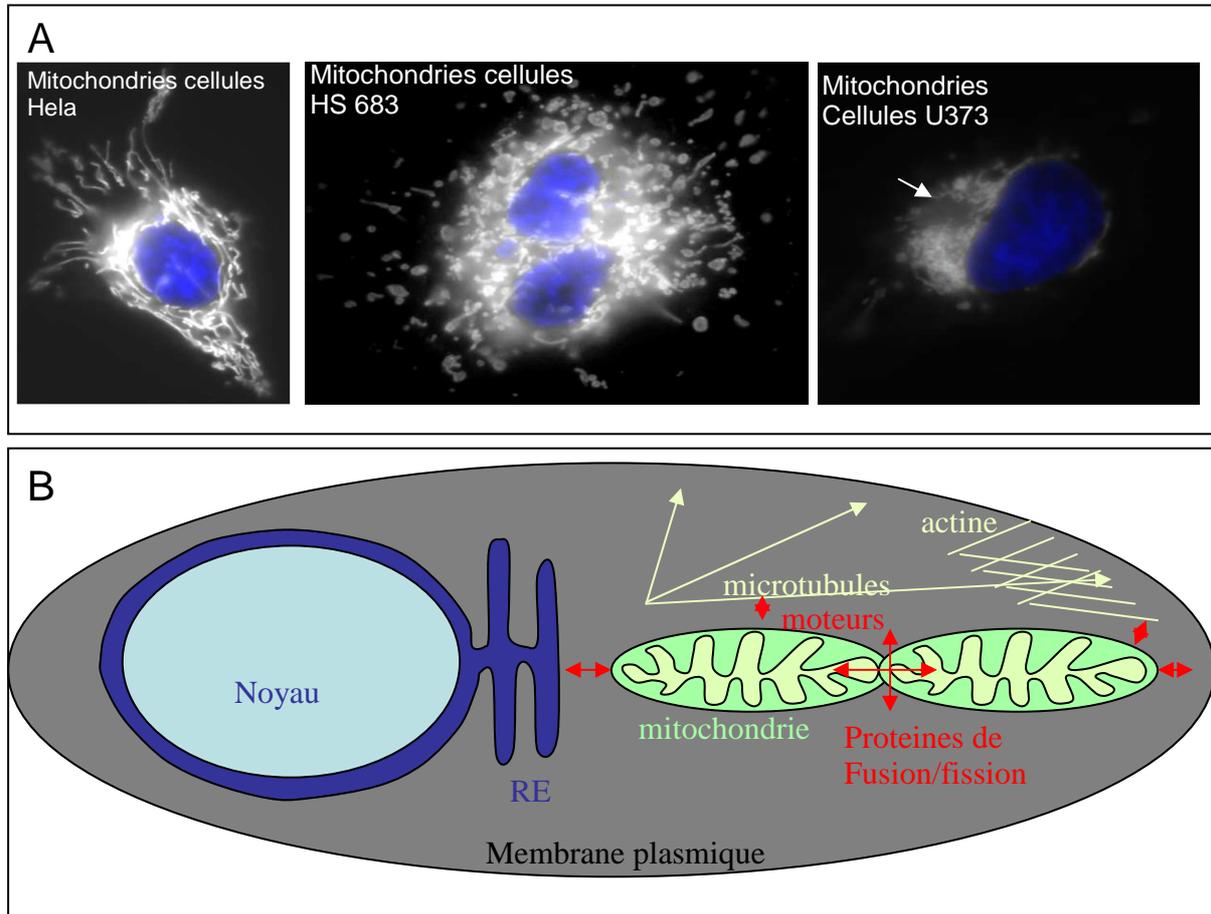


Figure 15 : La distribution et la morphologie cellulaires varient d'un type cellulaire à l'autre.

(A) Dans différentes lignées cellulaires : HeLa, U373, et HS683, les mitochondries sont visualisées dans les cellules vivantes à l'aide d'un mitotraker et apparaissent en blanc, les noyaux sont en blanc. Dans les cellules HeLa la morphologie des mitochondries est tubulaire, tandis que dans les cellules HS683 elle est vésiculaire. Dans ces deux types cellulaires, les mitochondries se répartissent tout le long de l'axe proximo-distal entre le noyau et les membranes plasmiques périphériques et se distribuent tout autour du noyau dans une symétrie radiale. Au contraire dans les cellules U373, les mitochondries s'accumulent de façon asymétrique à un pôle du noyau.

(B) Représentation schématique des différents acteurs impliqués dans la distribution, la morphologie, et le mouvement mitochondrial. Les principaux acteurs sont : la machinerie fusion/fission, les moteurs moléculaires qui permettent le mouvement le long du cytosquelette, et les protéines qui permettent l'ancrage sur le cytosquelette ou sur d'autres compartiments cellulaires.

Dans de nombreux types cellulaires, la majeure partie des mitochondries s'accumule dans les zones périnucléaires, tandis que la distribution des mitochondries périphériques est plus clairsemée (Collins et al., 2002; Tanaka et al., 1998; Trinczek et al., 1999). Mais le nombre, l'organisation, la morphologie, et la répartition subcellulaire du réseau mitochondrial, sont variables d'un type cellulaire à l'autre (Aw and Jones, 1989; Bereiter-Hahn, 1990). Le nombre de mitochondries dans un type cellulaire particulier corrèle avec la demande énergétique : les hépatocytes comportent des milliers de mitochondries, alors que les érythrocytes les ont toutes perdues. Dans les spermatozoïdes, les mitochondries forment une spirale dans la queue (Bereiter-Hahn, 1990) ; dans le muscle, les mitochondries insérées sous le sarcolemme sont ovales ; tandis que dans les fibroblastes et les cellules HeLa en culture, les mitochondries forment un réseau tubulaire (Barni et al., 1996; Rizzuto et al., 1998). Des études de microscopie électronique confirment ces différences morphologiques entre les mitochondries de différents types cellulaires (Ghadially, 1997).

Le réseau mitochondrial peut être observé sur des cellules vivantes grâce à un marqueur fluorescent des mitochondries. Différentes lignées cellulaires peuvent ainsi être comparées (Figure 15). Dans des cellules HeLa, le réseau mitochondrial présente un aspect tubulaire et continu, en revanche dans les cellules HS683 les mitochondries sont distinctes les unes des autres, et présentent une forme plus vésiculaire. A cette différence morphologique s'ajoutent des différences de distribution subcellulaire. Tout d'abord dans la distribution proximo-distale par rapport au noyau : dans les cellules HeLa, le réseau mitochondrial s'étend jusqu'à la périphérie de la cellule sous la membrane plasmique ; au contraire dans les cellules U373, les mitochondries sont agrégées à proximité du noyau. Ensuite une autre différence de répartition apparaît dans la symétrie par rapport au noyau. Dans les cellules HeLa, une symétrie radiaire répartit de façon homogène les mitochondries tout autour du noyau ; tandis que dans les cellules U373, cette répartition autour du noyau est complètement asymétrique, les mitochondries s'accumulent à un pôle du noyau. Cette imagerie sur des cellules vivantes souligne à quel point la morphologie et la répartition mitochondriales varient d'un type cellulaire à l'autre.

La comparaison du protéome de mitochondries de cerveau, de cœur, de rein, et de foie, montre que seules 50 % des protéines sont exprimées dans ces quatre tissus. Le protéome de la mitochondrie dépend donc très fortement du tissu dans lequel est présente la mitochondrie (Mootha et al., 2003). La capacité mitochondriale, le nombre de copies de l'ADN mitochondrial, les stœchiométries enzymatiques, les profils d'utilisation du carbone, et les voies de biosynthèse peuvent être spécialisés (Veltri et al., 1990; Vijayasarathy et al., 1998).

Ces résultats suggèrent que la spécificité tissulaire de la distribution subcellulaire et de la morphologie des mitochondries s'accompagne d'une spécialisation fonctionnelle. Si l'organisation du réseau mitochondrial varie d'un type cellulaire à l'autre, c'est que dans chaque type cellulaire les mitochondries s'accumulent à des sites précis.

Variation intracellulaire

Hétérogénéité dans la localisation

Il existe différentes populations de mitochondries dans une même cellule, un premier critère de classification peut être leur lieu d'ancrage préférentiel. Dans les cellules β -pancréatiques, les mitochondries peuvent être classifiées en trois populations distinctes : les mitochondries qui ceinturent les granules de sécrétion, les mitochondries ancrées sous la membrane plasmique, et les mitochondries qui s'accumulent tout autour du noyau (Park et al., 2001; Straub et al., 2000; Tinel et al., 1999) (figure 17). Dans les cellules musculaires, une population de mitochondries s'intercale entre le sarcolemme et le réticulum sarcoplasmique (RS). Mais, c'est dans les neurones que la localisation spécifique de différentes populations mitochondriales a été la mieux étudiée. Dans le système nerveux, la distribution des mitochondries corrèle avec l'activité métabolique locale (Kageyama and Wong-Riley, 1982). Les mitochondries sont adressées et s'accumulent aux sites qui requièrent un métabolisme intense : aux synapses (Bogan and Cabot, 1991; Gotow et al., 1991; Palay, 1956; Treeck and Pirsig, 1979), aux cônes de croissances actifs (Morris and Hollenbeck, 1993; Povlishock, 1976; Ruthel and Hollenbeck, 2003), aux nœuds de Ranvier, aux frontières de myélinisation/démyélinisation, (Bristow et al., 2002; Fabricius et al., 1993; Mutsaers and Carroll, 1998), aux zones de synthèse axonales. Dans une culture cellulaire de neurones de l'hippocampe, le nombre de mitochondries dendritiques corrèle avec le nombre et la plasticité des spines dendritiques et des synapses (Li et al., 2004). Les zones à activité élevée qui nécessitent une production intense d'ATP, ont une densité ou une activité mitochondriale supérieure (figure 17), comme le montre également la comparaison des synapses toniques et phasiques (Brodin et al., 1999; King et al., 1996; Nguyen et al., 1997), des cônes de croissance actifs et inactifs (Carroll and Wong-Riley, 1984; Chada and Hollenbeck, 2003; Kageyama and Wong-Riley, 1985; Morris and Hollenbeck, 1993; Nie and Wong-Riley, 1996a; Nie and Wong-Riley, 1996b; Wong-Riley and Carroll, 1984; Wong-Riley and Welt, 1980).

Une distribution régulée de manière dynamique

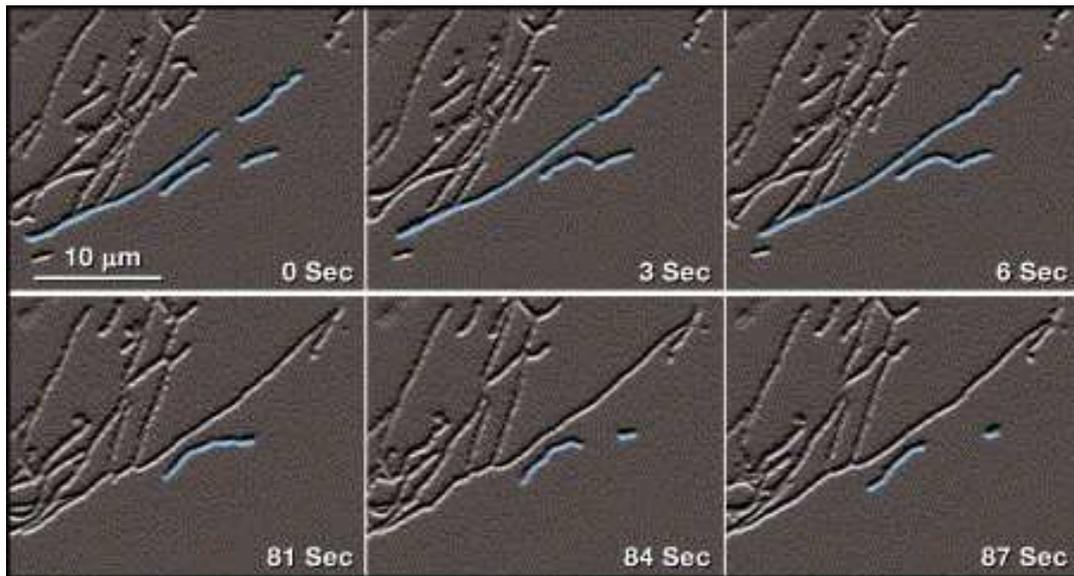


Figure 16 : Le réseau mitochondrial est perpétuellement réorganisé.

Observation en vidéo-microscopie de mitochondries marquées par YFP dans des fibroblastes de souris. Les mitochondries sélectionnées sont en bleu. Dans les trois premières images, des mitochondries se rejoignent et fusionnent. Dans la dernière image on observe une fission: une mitochondrie se divise en deux (d'après Chen et al., 2003).

Si la structuration du réseau mitochondrial varie d'un type cellulaire à un autre, ces réseaux ne sont pas statiques et peuvent évoluer très vite dans une même cellule : au cours du cycle cellulaire, au cours de la différenciation, ou lors de changements dans l'environnement cellulaire. Dans certaines lignées cellulaires une variation du réseau mitochondrial a été décrite en fonction du cycle cellulaire. Dans une lignée cellulaire humaine d'ostéosarcome (143B), les cellules en G1 présentent un réseau mitochondrial tubulaire, tandis que les cellules en phase S présentent des mitochondries plus fragmentées à la forme vésiculaire (Margineantu et al., 2002). Lors de la division cellulaire, la localisation cellulaire des mitochondries et leur transport assurent une répartition adéquate entre cellules filles (Pereira et al., 1997; Yaffe et al., 2003).

Au cours de la fécondation des ovocytes, les mitochondries précédemment réparties dans tout le cytoplasme s'accablent autour du noyau (Barnett et al., 1996; Bavister and Squirrell, 2000; Squirrell et al., 2001; Squirrell et al., 2003). Au contraire au cours de la différenciation des cellules souches, les mitochondries quittent leurs localisations périnucléaires pour devenir plus périphériques (Lonergan et al., 2006).

Chez la levure, comparées à leur culture sur du glucose, lorsque les cellules sont cultivées sur une source de carbone non fermentable, le nombre de branchements dans le réseau tubulaire des mitochondries peut être multiplié par 5 (Egner et al., 2002).

Hétérogénéité dans le déplacement

Ce profil de distribution des mitochondries qui n'est ni homogène, ni aléatoire, n'est pas non plus figé (figure 16). Une mitochondrie n'est jamais ancrée définitivement à un site précis. Si la distribution des mitochondries corrèle avec l'activité métabolique, alors, si l'activité métabolique change, la distribution mitochondriale doit également changer. Cet aspect dynamique résulte d'un équilibre pour chaque mitochondrie entre le déplacement dans la cellule et l'ancrage à des sites précis (Chada and Hollenbeck, 2003), deux paramètres variables. Dans l'axone d'un neurone par exemple, la vitesse et la durée de déplacement, l'orientation du mouvement, le temps de résidence à certains sites précis, varient d'une mitochondrie à l'autre (Chang et al., 2006), et permettent de classer les mitochondries en différentes populations. Mais concernant les caractéristiques de déplacement, les différences les plus marquées s'observent lors de la comparaison des mitochondries qui n'ont pas les mêmes répartitions subcellulaires. La plupart des mitochondries localisées à la périphérie restent immobiles ou migrent doucement, seule une petite fraction se déplace à une vitesse relativement élevée (De Vos et al., 2003; Trinczek et al., 1999). Dans les neurones, la vitesse de déplacement dans les axones ou les dendrites n'est pas identique (Overly et al., 1996). Toujours dans les cellules nerveuses, si le déplacement de mitochondries le long de l'axone est relativement rapide, $0.3-2 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (Hollenbeck, 1996; Ligon and Steward, 2000a), le déplacement est ni continu, ni régulier. En raison de l'alternance de périodes d'immobilité et de périodes de mouvements rapides, la vitesse moyenne de déplacement des mitochondries se situe entre les petites vésicules à mouvement rapide et les protéines du cytosquelette à mouvement lent (Grafstein and Forman, 1980).

Hétérogénéité fonctionnelle

Dans une même cellule, une hétérogénéité entre les mitochondries peut être observée d'un point de vue fonctionnel : le potentiel membranaire, les entrées de calcium dans les mitochondries (figure 24), la cinétique d'ouverture PTP varient d'une mitochondrie à l'autre (Collins et al., 2002).

Chez les neurones, le potentiel $\Delta\psi$ n'est pas identique dans toutes les mitochondries, il existe une corrélation entre le potentiel membranaire $\Delta\psi$ des mitochondries et leur localisation (Collins et al., 2002; Overly et al., 1996), leur activité synaptique (Bindokas et al.,

1998), ou leur déplacement le long de l'axone (Miller and Sheetz, 2004; Rintoul et al., 2006). 90% des mitochondries avec un potentiel membranaire élevé migrent vers le cône de croissance, 80 % des mitochondries avec un potentiel faible migrent vers le corps cellulaire. Suite à une stimulation, les entrées de calcium à la mitochondrie ne sont pas homogènes et dépendent du positionnement de chaque mitochondrie, ainsi que de la voie de signalisation activée (Collins et al., 2002; Filippin et al., 2003; Park et al., 2001). Cela a notamment été montré dans les cellules de chromaffin, les cellules pancréatiques des acini (Montero et al., 2000; Park et al., 2001; Straub et al., 2000; Tinel et al., 1999), les hépatocytes (Hajnoczky et al., 1995), ou les cardio-myocytes (Robert et al., 2001). Les augmentations calciques mitochondriales sont d'autant plus fortes que les mitochondries sont à proximité du lieu de libération du calcium, le RE dans les cellules Hela lors d'une stimulation IP3 (Filippin et al., 2003) (figure 24), la membrane plasmique lors de la stimulation des cellules neurales (Baron et al., 2003; Pivovarova et al., 1999).

Distribution des mitochondries et physiologie de l'organisme et de la cellule

L'inactivation de gènes impliqués dans l'organisation du réseau mitochondrial est létale aux stades embryonnaires, qu'ils s'agissent de gènes impliqués dans le mouvement, l'ancrage des mitochondries le long du cytosquelette (Nangaku et al., 1994; Tanaka et al., 1998), ou la morphologie mitochondriale (Chen et al., 2003). L'inactivation, lorsqu'elle est ciblée et tissu-spécifique, s'accompagne de phénotypes drastiques. Chez les drosophiles, comme cela a été montré pour les mutations induites dans le gène Milton (Stowers et al., 2002), drp1 (Verstreken et al., 2005), Miro (Guo et al., 2005), la suppression des mitochondries localisées à l'extrémité des photorécepteurs s'accompagne d'un phénotype fort : les drosophiles sont aveugles, et il y a une dérégulation de la transmission synaptique. L'absence de mitochondries présynaptiques chez le mutant Miro s'accompagne d'une atrophie musculaire post synaptique, et la complémentation de la mutation par l'expression du gène sauvage, restreinte aux zones pré-synaptiques, est suffisante pour rétablir la morphologie post-synaptique des muscles. Différentes études montrent également que la localisation mitochondriale participe au contrôle du nombre de synapses, et régule la morphologie, la plasticité, et la potentialisation synaptique (Guo et al., 2005; Li et al., 2004).

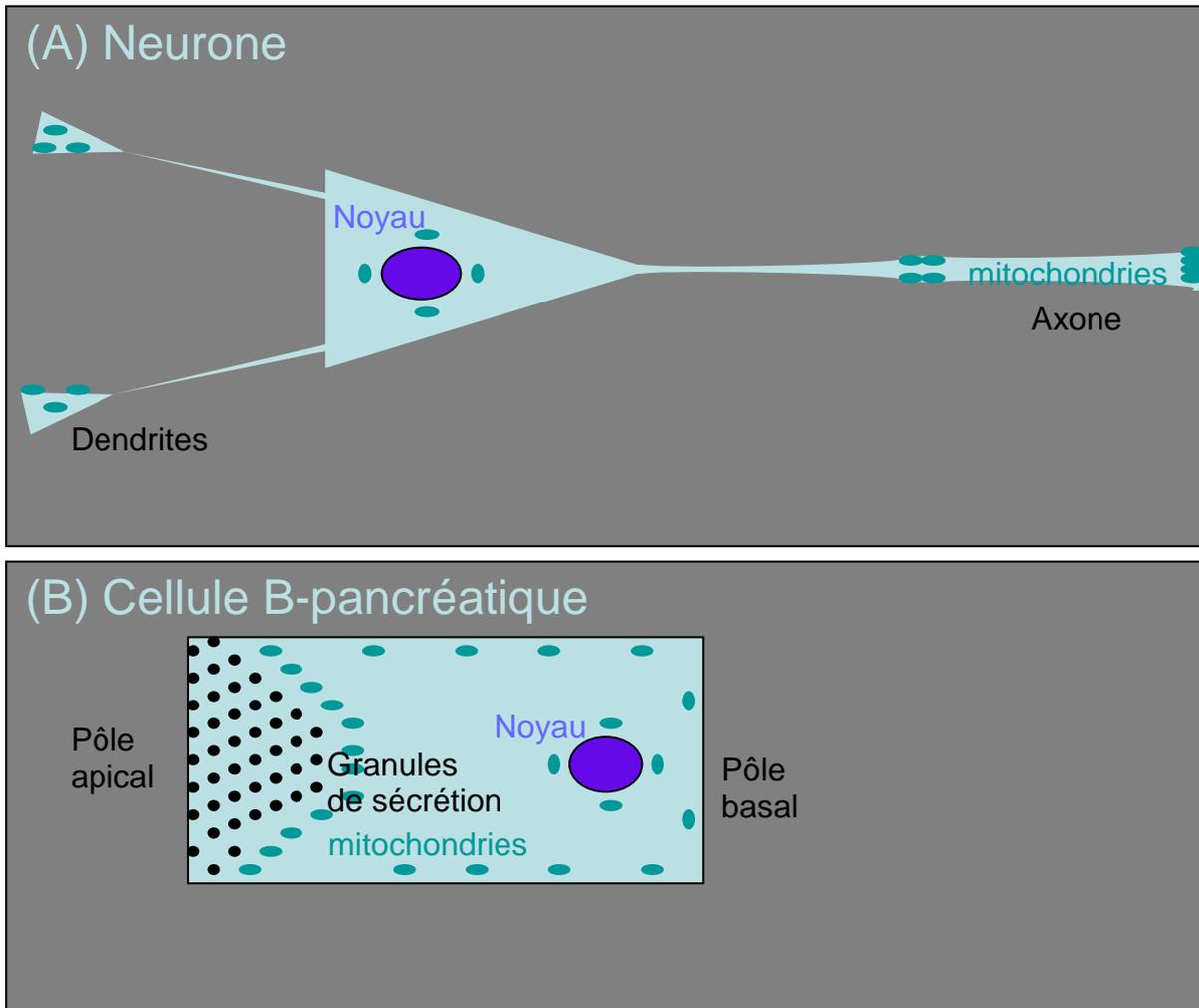


Figure 17 : Accumulation des mitochondries à des sites spécifiques.

(A) L'exemple du neurone. Les mitochondries s'accumulent aux zones pré et post synaptiques, aux nœuds de Ranvier et autour du noyau.

(B) L'exemple de la cellule β -pancréatique. Dans ces cellules, les mitochondries peuvent être classées en trois populations différentes : la ceinture qui entoure les granules de sécrétion, les mitochondries réparties sous la membrane plasmique, les mitochondries qui s'agrègent autour du noyau.

Si les caractéristiques fonctionnelles mitochondriales (entrée du calcium, potentiel de membrane, respiration) varient suivant leur localisation, une modification de leur position ne rend pas pour autant les mitochondries non fonctionnelles. Dans les exemples présentés ci-dessus, lorsque cela a été testé, il n'a pas été observé de modification majeure et notable des capacités métaboliques mitochondriales, le potentiel de membrane est présent, les mitochondries respirent, produisent de l'ATP, sont capables de stocker et de relâcher le calcium. Ce n'est donc pas le fonctionnement métabolique de la mitochondrie, mais véritablement son positionnement subcellulaire, qui est à l'origine des défauts phénotypiques

observés. Le bon positionnement des mitochondries à des sites spécifiques est donc crucial pour le bon fonctionnement des cellules.

Si de nombreuses études ont déjà comparé le protéome de mitochondries issues de différents tissus, il serait également intéressant de comparer dans un même type cellulaire le protéome de différentes populations mitochondriales : mitochondries associées au RE, mitochondries associées à la membrane plasmique, mitochondries associées aux vésicules de sécrétion.

Mitochondries et cytosquelette

Microtubules

La localisation et la distribution des mitochondries nécessitent un réseau de microtubules intègre (Ball and Singer, 1982), et les mitochondries peuvent se déplacer le long de ce réseau de microtubules (Morris and Hollenbeck, 1995) (figure 18). La famille des kinésines 1 est capable de fixer les mitochondries (Jellali et al., 1994; Khodjakov et al., 1998; Leopold et al., 1992). Ainsi, l'inhibition de la kinésine 1 chez la drosophile inhibe de 70 à 90 % le mouvement des mitochondries le long des axones moteurs (Pilling et al., 2006).

Chez la souris les invalidations de Kif1B (kinesin-3 motor) ou Kif5B (kinesin-1 motor), deux moteurs de la famille des kinésines qui fixent les mitochondries et permettent leur mouvement le long des microtubules, sont létales aux stades embryonnaires (Nangaku et al., 1994; Tanaka et al., 1998). Dans des essais *in vitro*, KIF1B (kinesin-3 motor) permet le mouvement des mitochondries le long des microtubules à une vitesse similaire à celle observée *in vivo* le long des axones (Nangaku et al., 1994), et *in vivo* cette protéine régule la répartition des mitochondries (Wozniak et al., 2005). L'invalidation du gène kif5B (kinesin-1 motors) aboutit à une accumulation mitochondriale peri-nucléaire (Tanaka et al., 1998; Wu et al., 1998), phénotype qui peut être reversé par la surexpression de Kif5B exogène. La kinésine 1 semble donc impliquée dans le transport antérograde des mitochondries.

Des protéines adaptatrices établissent la connexion entre le moteur moléculaire et les mitochondries (figure 18). La protéine MIRO, une protéine transmembranaire mitochondriale, est localisée à la membrane externe, et caractérisée par deux domaines GTPase et deux motifs de fixation du calcium de type main EF. Elle est nécessaire au transport antérograde des mitochondries chez la drosophile (Guo et al., 2005), les cellules humaines (Fransson et al., 2003; Fransson et al., 2006), et la levure (Frederick et al., 2004). La protéine Milton est une protéine adaptatrice qui permet l'interaction entre la chaîne lourde des kinésines (Kif5B) et la

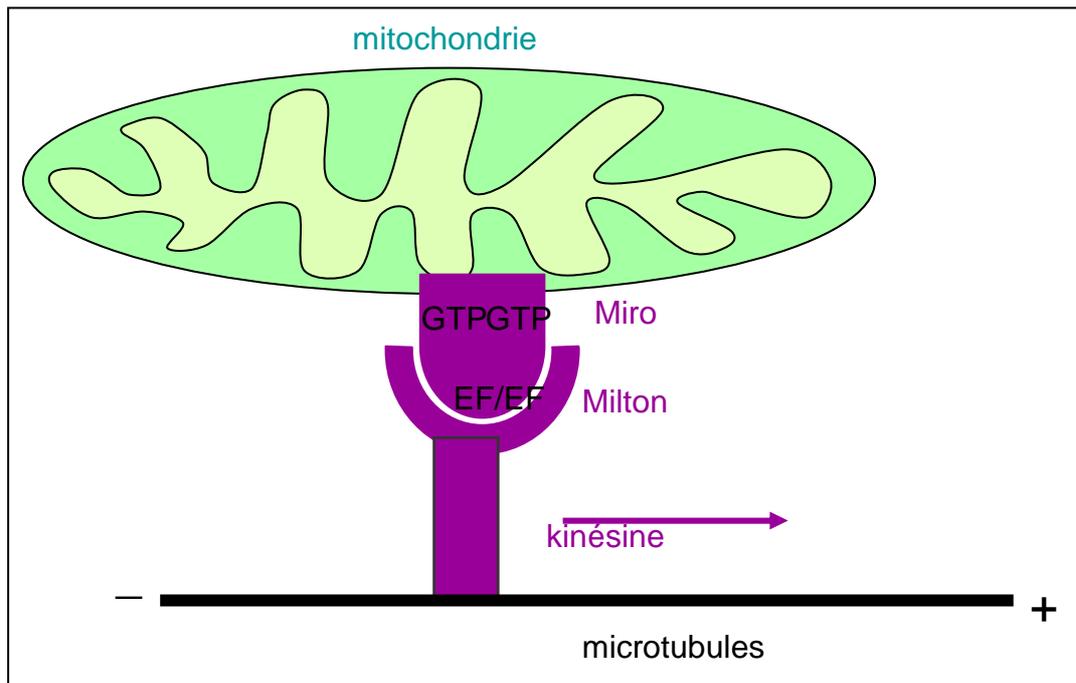


Figure 18 : Représentation schématique du complexe protéique qui permet le mouvement antérograde des mitochondries le long des microtubules.

Miro et Milton sont les deux protéines adaptatrices qui confèrent la spécificité de l'interaction des mitochondries avec les moteurs moléculaires de la famille des kinésines, permettant ainsi le transport antérograde des mitochondries le long des microtubules. La protéine Miro contient deux sites GTPase (GTP), ainsi que deux sites de liaison au calcium main EF.

protéine mitochondriale MIRO (Glater et al., 2006), c'est elle qui assure la sélectivité du transport des mitochondries par rapport à d'autres vésicules (Glater et al., 2006; Gorska-Andrzejak et al., 2003; Stowers et al., 2002). L'invalidation de l'une ou l'autre de ces protéines s'accompagne d'une disparition des mitochondries aux zones distales dans les axones et à leur accumulation péri-nucléaire. La disparition des mitochondries périphériques perturbe la morphologie ainsi que le fonctionnement des boutons synaptiques, tandis que l'accumulation périnucléaire favorise l'entrée en apoptose de ces cellules.

La chaîne lourde des dynéines peut s'associer avec les mitochondries, de même qu'avec d'autres organelles (Habermann et al., 2001). L'inhibition des protéines dynéines a de nombreux effets, parmi lesquels une diminution des mouvements mitochondriaux et une altération des répartitions mitochondriales (Bowman et al., 1999; Koushika et al., 2004; LaMonte et al., 2002; Martin et al., 1999; Pilling et al., 2006). Chez la drosophile, dans les axones moteurs, l'utilisation de mutants hypomorphes de la chaîne lourde 64C de la dynéine réduit les mouvements rétrogrades de 43% en longueur et 30% en durée (Pilling et al., 2006).

Dans ces conditions, la dynéine semble donc être la composante majeure du transport rétrograde. Cependant la fonctionnalité de la dynéine dépend de la kinésine puisque l'inactivation de la kinésine 1 (Pilling et al., 2006) ou de son interactant Aplipl1 (Horiuchi et al., 2005) abolit également les mouvements rétrogrades.

La protéine Tau est un autre acteur impliqué dans la répartition des mitochondries le long du réseau de microtubules. Le traitement de cellules par des céramides-C2 induit une activation de CDK5 qui phosphoryle Tau et la libère dans la fraction cytoplasmique, favorisant ainsi le transport rétrograde des mitochondries et leur accumulation périnucléaire autour du centrosome (Darios et al., 2005).

Cependant, si la déstabilisation des microtubules par des drogues altère fortement le mouvement des mitochondries, le mouvement des mitochondries n'est pas totalement inhibé. Pour cela il est nécessaire de déstabiliser de façon simultanée le réseau d'actine (Morris and Hollenbeck, 1995). Ce qui suggère que le réseau d'actine peut également participer au mouvement des mitochondries.

Actine

Le cytosquelette d'actine est une structure dynamique qui participe au maintien de la polarité cellulaire, au trafic intracellulaire des organelles, à la mobilité, à la division cellulaire.

Chez la levure des mutations dans les monomères d'actine induisent une désorganisation des mitochondries (Drubin et al., 1993), et de nombreux articles ont caractérisé des protéines impliquées dans la localisation et le déplacement des mitochondries dépendant de l'actine. Cependant chez les eucaryotes supérieurs, les acteurs de ces interactions entre l'actine et les mitochondries sont beaucoup moins connus.

Chez les eucaryotes supérieurs, les mitochondries peuvent également se déplacer le long des filaments d'actine (Ligon and Steward, 2000b; Morris and Hollenbeck, 1995). Des moteurs moléculaires sont impliqués dans ces mouvements (Nangaku et al., 1994; Tanaka et al., 1998). Cependant les moteurs moléculaires qui permettent le mouvement des mitochondries le long de l'actine n'ont pas été identifiés, même s'il existe de nombreux candidats potentiels dans la famille des myosines.

Les mitochondries peuvent se déplacer le long du réseau d'actine. Mais ce réseau permet aussi l'ancrage mitochondrial : lorsque le réseau d'actine est désorganisé, le mouvement global des mitochondries augmente (Morris and Hollenbeck, 1995). Si les acteurs moléculaires qui contrôlent le mouvement mitochondrial le long du réseau d'actine ne sont pas identifiés, en

revanche l'immobilisation des mitochondries sur ce réseau est mieux comprise. La fixation des mitochondries sur les filaments d'actine est régulée par la petite GTPase RhoA et son effecteur mDia1/diaphorous, ce qui contrôle la mobilité des mitochondries (Minin et al., 2006) : un dominant positif de Mdia1 inhibe la mobilité mitochondriale et les mitochondries restent fixées sur les micro-filaments d'actine. L'actine joue ainsi un rôle important dans le regroupement en clusters des mitochondries pré-synaptiques à la jonction neuromusculaire (Lee and Peng, 2006). Dans les axones, lors de l'accumulation localisée de mitochondries induite par des billes HB-GAM (Lee and Peng, 2006), les protrusions d'actine sont nécessaires pour permettre l'ancrage localisé des mitochondries. L'actine semble donc être un élément essentiel pour l'immobilisation, l'ancrage et l'accumulation des mitochondries à un site spécifique.

Filaments intermédiaires

Les travaux effectués sur les souris invalidées pour la desmine soulignent l'importance des filaments intermédiaires pour une répartition et une morphologie correctes des mitochondries. (Capetanaki, 2002; Paulin et al., 2004). De plus, une desmine tronquée induit l'agrégation focale des mitochondries (Schroder et al., 2003). Un phénotype identique est observé chez les patients dont le gène codant pour NF-L est muté, ce qui cause des neuropathies. Dans ce dernier cas, la concentration et la formation de clusters mitochondriaux périnucléaires sont associées avec une diminution du transport axonal de NF (Brownlees et al., 2002; Perez-Olle et al., 2005; Straube-West et al., 1996).

Morphologie mitochondriale

Machinerie fusion/fission

Un des processus clef dans le contrôle de la morphologie mitochondriale est l'équilibre entre la fusion et la fission (figure 19). Si l'équilibre penche vers la fusion, le réseau mitochondrial est tubulaire (Bleazard et al., 1999; Labrousse et al., 1999; Sesaki and Jensen, 1999; Smirnova et al., 2001), tandis que si l'équilibre penche vers la fission le réseau est vésiculaire (Chen et al., 2003; Hermann and Shaw, 1998). Les processus de fusion et de fission sont permanents. Ainsi si deux cellules sont fusionnées pour former une cellule hybride, en huit heures les deux populations mitochondriales se sont complètement mélangées (Chen et al., 2003; Legros et al., 2002).

Les mitofusines 1 et 2 (MFN1 et MFN2) sont des GTPases de la famille des dynamines. Localisées à la membrane externe de la mitochondrie, elles sont essentielles pour le

regroupement et la fusion des membranes (Chen et al., 2003; Legros et al., 2002; Santel et al., 2003; Santel and Fuller, 2001). MFN2 aurait un rôle régulateur (Ishihara et al., 2004), tandis que MFN1 serait impliquée dans la juxtaposition des membranes (Koshiba et al., 2004), 2004). Lors du processus de fusion MFN1, protéine de la membrane externe, coopère avec la protéine Atrophie optique 1(OPA1), protéine de la membrane interne, une autre GTPase de la famille des dynamines (Cipolat et al., 2004).

Lors du processus inverse de la fusion, la fission, la protéine DRP1 (Dynamamin-related protein 1), encore une GTPase membre de la famille des dynamines, initialement localisée dans le cytoplasme, transloque à la membrane externe de la mitochondrie où elle interagit avec hFIS1. DRP1 semble à la fois participer à la fusion des membranes externes et internes (Griffin et al., 2005; James et al., 2003; Smirnova et al., 2001; Yoon et al., 2003).

Une nouvelle protéine, GDAP1, semble contrôler la fission des mitochondries, mais sa fonction au niveau moléculaire reste inconnue (Niemann et al., 2005).

Fission/Fusion et régulation du transport et de la répartition des mitochondries

L'invalidation des protéines de fusion Mfn1 ou Mfn2 semble s'accompagner d'une altération du mouvement directionnel (Chen et al., 2003). La mutation d'OPA1 ne se réduit pas à une modification morphologique des mitochondries, mais s'accompagne d'une mauvaise répartition de celles-ci (Delettre et al., 2000; Kamei et al., 2005). De même, Drp1 qui promeut la fission des mitochondries, favorise le transport antérograde (Varadi et al., 2004b): son invalidation induit une agrégation des mitochondries et diminue nettement la quantité de mitochondries présentes à la synapse (Verstreken et al., 2005), et l'absence de mitochondries dans les zones distales des cellules photo-réceptrices rend les drosophiles aveugles. De même l'invalidation de hFis1, partenaire de Drp1 dans la fission, s'accompagne d'un problème dans la distribution subcellulaire des mitochondries (James et al., 2003; Yoon et al., 2003). Tous ces résultats montrent que la distribution subcellulaire des mitochondries est difficilement dissociable de leur morphologie et donc du fonctionnement de la machinerie de fusion et de fission.

Fusion/fission et fonction mitochondriale

L'importance fonctionnelle de l'équilibre entre la fusion et la fission est confirmée au niveau de l'organisme entier, l'invalidation des gènes Mfn1 ou Mfn2 chez la souris empêche le développement embryonnaire (Chen et al., 2003). Les gènes MFN2, GDAP1 et OPA1 sont

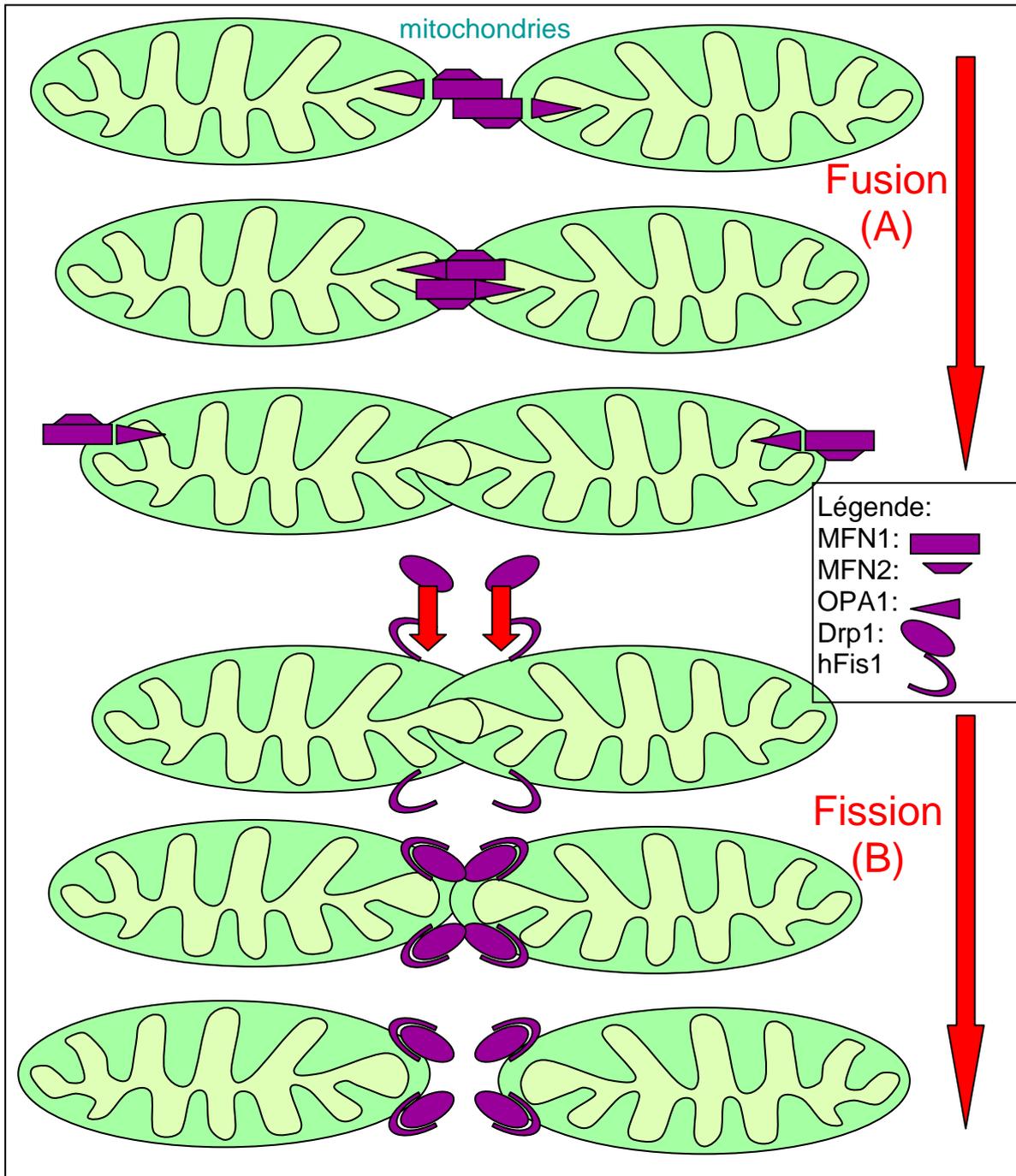


Figure 19 : Machinerie fusion/fission à la mitochondrie

Machinerie de fusion (A). Les protéines Mfn1 et Mfn2, protéines transmembranaires, permettent l'apposition et la fusion des membranes mitochondriales externes. Mfn2 aurait un rôle régulateur. L'interaction de Mfn1 avec la protéine de la membrane interne Opa1 permettrait la fusion des membranes internes.

Machinerie de fission (B). La protéine Drp1 cytosolique transloque à la mitochondrie où elle interagit avec hFis1.

associés à des maladies neurodégénératives (Alexander et al., 2000; Delettre et al., 2000; Zuchner et al., 2004). Chez l'homme, la mutation du gène Opa1, gène fortement exprimé dans

la rétine, induit une agrégation des mitochondries qui s'accompagne d'une atrophie optique de type 1 (OPA1), maladie génétique transmise de façon dominante (Delettre et al., 2000; Kamei et al., 2005). Les mutations de MFN2 ou de GDAP1 s'accompagnent d'une dégénérescence des neurones moteurs et sensoriels les plus longs (Zuchner and Vance, 2005; Zuchner et al., 2006) (Niemann et al., 2005).

L'équilibre entre la fusion et la fission est essentiel pour la maintenance et l'homogénéisation de l'ADN mitochondrial (Chen et al., 2003; Kim et al., 2005; Nakada et al., 2001; Nunnari et al., 1997; Rapaport et al., 1998; Sesaki and Jensen, 1999). Il contrôle également l'état métabolique des mitochondries (Chen et al., 2005; Chen et al., 2003; Delettre et al., 2000; Kim et al., 2005; Lodi et al., 2004). Un réseau interconnecté physiquement par la continuité de la matrice (lumière) mitochondriale (Rizzuto et al., 1998) peut permettre le transfert de l'énergie ou du calcium entre différentes zones de la cellule (De Giorgi et al., 2000; Skulachev, 2001).

Apoptose/survie et fission/fusion

Chez les cellules Hela et COS-7 l'apoptose peut être induite par l'ajout de staurosporine. La progression de l'apoptose s'accompagne d'une fragmentation des mitochondries. Cette fragmentation a également été observée *in vivo* chez le nématode : au cours du développement l'apoptose est utilisée pour éliminer les cellules surnuméraires (Jagasia et al., 2005). Les mécanismes de fusion et de fission participent au processus apoptotique (figure 19). Aux stades précoces de l'apoptose, Bax transloque aux sites de fission où les éléments de la machinerie fission-fusion s'accumulent en clusters et initient le processus de fragmentation (Karbowski et al., 2002). L'inhibition de la fusion dépendante de MFN1 (Karbowski et al., 2004), ainsi que la translocation de Drp1 à la mitochondrie au cours de l'apoptose, induisent une fragmentation des mitochondries (Frank et al., 2001), à laquelle succède une perte du potentiel membranaire, l'ouverture du PTP (Permeability Transition Pore), une rétraction de la matrice, une augmentation de la perméabilité de la membrane externe, une réorganisation des cristae (Germain et al., 2005) qui s'accompagne de la libération de nombreux facteurs apoptotiques, notamment le cytochrome C et vAIF. Dans le cytosol, ceux-ci jouent le rôle de cofacteurs des caspases et participent aux cascades protéolytiques. Les concentrations calciques cytosoliques contrôlent de nombreuses protéases, kinases et phosphatases impliquées dans l'apoptose.

Chez la levure la fragmentation des mitochondries induite par l'orthologue de DRP1, Dnm1, promeut une mort cellulaire similaire à l'apoptose (Fannjiang et al., 2004). Chez les

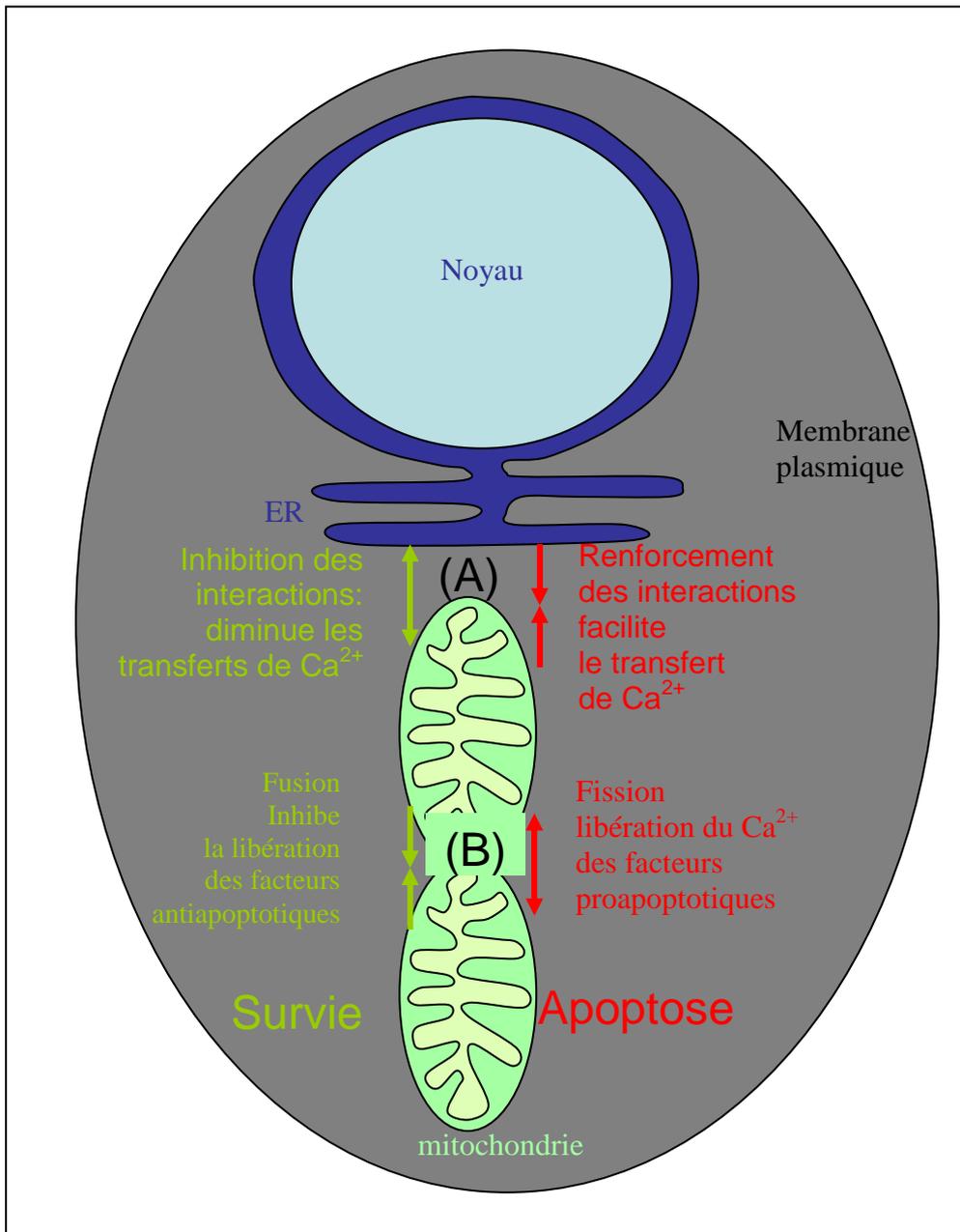


Figure 20 : La structure du réseau mitochondrial influence l'entrée et la progression de l'apoptose à deux niveaux : les interactions entre le RE et les mitochondries, l'équilibre fusion/fission.

(A) Interactions entre le RE et les mitochondries. L'interaction étroite entre le RE et les mitochondries favorise les transferts de calcium et l'entrée en apoptose.

(B) Equilibre fusion/fission. Le processus de fission favorise la libération du calcium et des facteurs proapoptotiques par les mitochondries, tandis que la fusion inhibe la progression de l'apoptose.

mammifères, l'expression des protéines de fusion, MFN1 et MFN2, seules ou ensemble, empêche l'entrée en apoptose (Neuspiel et al., 2005; Sugioka et al., 2004). De même, la transfection d'un mutant dominant négatif Drp1 inhibe la fission des mitochondries, la chute du potentiel de membrane $\Delta\psi$, la libération du cytochrome c, et l'apoptose (Frank et al.,

2001; Karbowski et al., 2002; Lee et al., 2004b). Chez le nématode l'inhibition de Drp1 s'accompagne de l'apparition de cellules surnuméraires lors du développement (Jagasia et al., 2005). Lors de l'apoptose induite par un transfert de calcium entre RE et mitochondries, la translocation de Drp1 et la fragmentation des mitochondries sont dépendantes du calcium (Breckenridge et al., 2003).

Ainsi la rupture de l'équilibre entre fusion et fission s'accompagne d'une rupture de l'équilibre entre les signaux de survie et d'apoptose. La machinerie de fusion et de fission est donc un acteur direct dans le contrôle de l'entrée et de la progression de l'apoptose. La fusion peut inhiber l'apoptose, tandis que la fission est nécessaire à la progression de la voie apoptotique mitochondriale. Nous verrons par la suite qu'en plus de la morphologie, la distribution des mitochondries, notamment par rapport au RE, contrôle la progression de l'apoptose.

L'étude de la machinerie moléculaire qui contrôle les processus de fission et de fusion est récente, a connu des progrès très rapides, et est très à la mode. Mais d'autres processus jouent probablement un rôle clef dans le contrôle de la morphologie mitochondriale, notamment des protéines structurelles qui contrôlent la courbure des membranes comme cela a été décrit pour le RE par exemple avec les protéines Rtn4a/NogoA et DP1/Yop1p (Voeltz et al., 2006).

D'autres axes prometteurs sont : la découverte de protéines impliquées dans la morphologie des cristae comme OPA1 qui ouvrent de nouveaux champs d'exploration, ou, bien que déjà étudiée, la régulation des sites de contacts entre membranes interne et externe des mitochondries qui réserve probablement encore de nombreuses surprises.

Il reste à identifier quels sont les régulateurs, les stimuli, les senseurs, qui permettent une hétérogénéité de morphologie mitochondriale dans une même cellule. Si la morphologie des mitochondries varie d'un type cellulaire à l'autre, elle varie également dans une même cellule, par exemple dans les neurones corticaux, les mitochondries présynaptiques sont plus vésiculaires tandis que les mitochondries postsynaptiques sont plus tubulaires (Chang et al., 2006). Cette morphologie est donc finement régulée et ne se réduit pas à un déplacement d'équilibre entre protéine de fusion et protéine de fission, régulé au niveau transcriptionnel. Dans la cellule, chaque microenvironnement doit comporter des molécules régulatrices de cette morphologie. Et il reste à identifier au niveau physiologique quels stimulus contrôlent de façon locale et dynamique la morphologie mitochondriale.

Calcium et contrôle de la mobilité et du positionnement mitochondrial

Au cours de la fécondation des ovocytes, suite à la vague calcique, les mitochondries précédemment réparties dans tout le cytoplasme s'accumulent autour du noyau (Barnett et al., 1996; Bavister and Squirrell, 2000; Squirrell et al., 2001; Squirrell et al., 2003). Quelles que soient les conditions physiologiques qui induisent une modification du positionnement mitochondrial, le calcium y joue un rôle clef.

Chez les neurones, l'application localisée de NGF sur l'axone induit une accumulation localisée de mitochondries via le récepteur TrkA (Chada and Hollenbeck, 2004). Les voies PI3 and MAPK sont en aval de TrkA. Les niveaux de phosphatidyl inositol 4,5 biphosphate modifient par ailleurs la direction, et diminuent également le mouvement des mitochondries le long des microtubules (De Vos et al., 2003). Il est connu que le clivage du phosphatidyl inositol 4,5 biphosphate produit de l'inositol 1, 4, 5-triphosphate qui a son tour mobilise les stocks calciques pour induire une oscillation des concentrations de calcium cytosoliques. Ainsi le mouvement des mitochondries est inhibé par les signalisations calciques induites par le récepteur à la ryanodine ou le récepteur à l'IP3.

Dans les cellules neurales, l'application de la molécule HB-GAM induit la formation des canaux calciques en clusters, ce qui induit des micro-domaines à calcium. L'application de cette même molécule induit également l'agrégation en clusters des mitochondries (Lee and Peng, 2006).

L'inhibition du mouvement mitochondrial est calcium-dépendant lors d'une stimulation des récepteurs NMDA dans les neurones (Rintoul et al., 2003). Cette immobilisation des mitochondries aux zones à forte concentration calcique, favorise leur accumulation dans ces zones, et les mitochondries peuvent alors tamponner de façon locale les augmentations de concentrations calciques (Yi et al., 2004).

Cependant l'entrée de calcium à l'intérieur des mitochondries n'est pas nécessaire pour inhiber le mouvement mitochondrial, le ou les senseurs à calcium qui régulent la mobilité des mitochondries sur les microtubules restent à identifier. Il existe plusieurs candidats potentiels, notamment deux protéines caractérisées au niveau structural par la présence d'un domaine senseur à calcium, la main EF. Ce domaine est présent chez Miro (Fransson et al., 2003; Frederick et al., 2004) et sa mutation induit une agrégation des mitochondries (Fransson et al., 2006). La S100B (Vance and Steenbergen, 2005) pourrait également réguler la répartition des mitochondries.

Interactions entre le RE et les mitochondries

Interaction physique entre le RE et les mitochondries

L'observation en microscopie électronique de sites de contacts entre le RE et les mitochondries dans de nombreux types cellulaires est assez ancienne (Franke and Kartenbeck, 1971; Pickett et al., 1980; Shore and Tata, 1977; Sommer and Johnson, 1970), mais il n'était pas clair que ces jonctions soient stables, et représentatives de domaines fonctionnels, plutôt qu'une association aléatoire. Des techniques de fixation des tissus plus récentes, comme la congélation ultrarapide, ont renforcé l'idée que les structures observées, où le RE et les mitochondries sont physiquement associés, ne sont pas des artefacts de fixation (Pezzati et al., 1997). La microscopie électronique à haut voltage, associée à des reconstitutions 3D, montre que dans les cellules hépatiques les mitochondries peuvent être enveloppées par les membranes du RE, enfouies entre les différentes lamelles du RE (Mannella, 2000; Mannella et al., 1998) (figure 21).

La plus grande avancée a été permise par l'augmentation de la résolution de l'imagerie à fluorescence sur cellules vivantes, ce qui a permis de montrer que de telles interactions sont physiologiques (figure 21). Sur des cellules Hela vivantes il a ainsi été montré que les mitochondries sont en contact étroit avec le réticulum sur 15 % de leur surface, et la distance entre ces deux organelles est au moins inférieure à 100 nm, une résolution plus fine ne pouvant être obtenue sur des cellules vivantes (Rizzuto et al., 1998).

Dans le RE certaines protéines ne sont pas réparties de façon homogène, et définissent des micro-domaines associés aux mitochondries. Ainsi en microscopie photonique à fluorescence il a été montré dans différents types cellulaires un fort recouvrement du marquage entre les mitochondries et certaines protéines du RE, le récepteur à l'IP3 (Jaconi et al., 2000; Mignery et al., 1989; Satoh et al., 1990; Simpson et al., 1997; Simpson et al., 1998; Takei et al., 1992), le récepteur RyR (Sharma et al., 2000), la pompe à calcium SERCA (Simpson et al., 1997), la calreticuline, ou le récepteur AMF-R. Il n'existe pas un tel recouvrement pour d'autres protéines réparties de façon plus homogène dans le réseau du RE.

Enfin l'interaction physique entre les mitochondries et une sub-fraction du RE a été montrée par des approches biochimiques (Achleitner et al., 1999; Gaigg et al., 1995). Le fractionnement par centrifugation différentielle permet de séparer les mitochondries des autres organelles, notamment du RE, à l'exception d'une petite fraction de celui-ci, les membranes associées aux mitochondries (MAM). Différents marqueurs caractérisent ces MAMs : la PSS1 et PSS2 (Simbeni et al., 1991; Stone and Vance, 2000; Vance, 1990), l'acyl-CoA : cholestérol

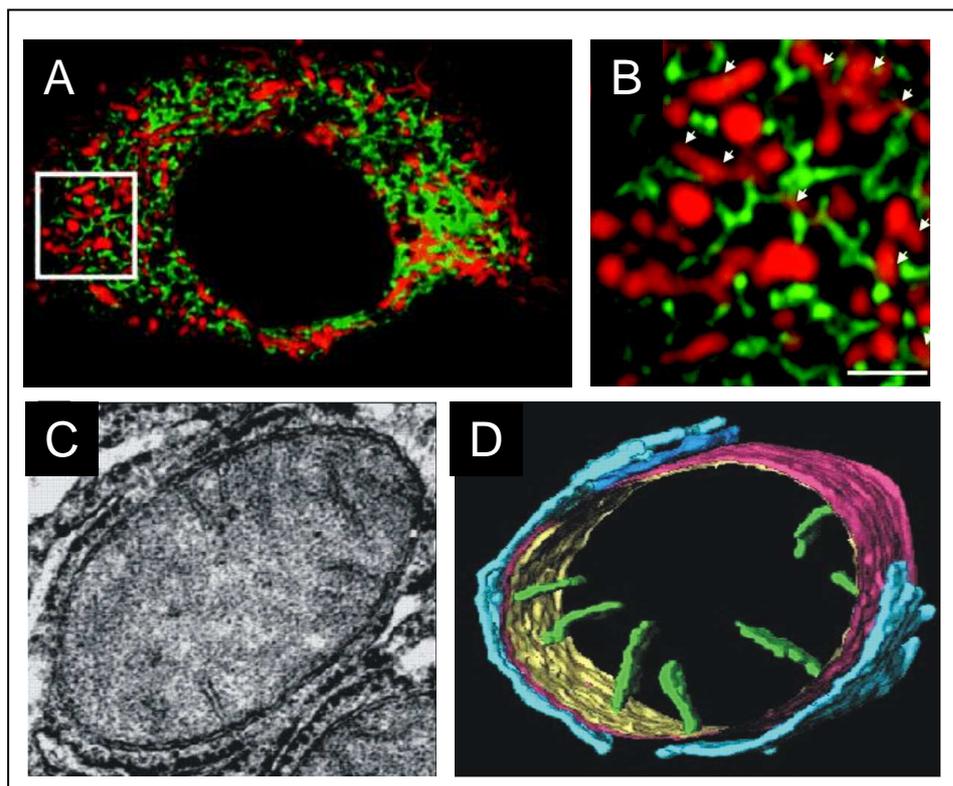


Figure 21 : Interaction entre mitochondries et RE

Microscopie à fluorescence sur cellules vivantes (d'après (Varadi et al., 2004a)) (A). L'utilisation de marqueurs fluorescents spécifiques des mitochondries et du RE, ici en rouge et vert respectivement, permet la reconstitution en 3D des réseaux de mitochondries et de RE de cellules vivantes. Il a pu ainsi être montré que 15 % de la surface des mitochondries est étroitement associée avec le RE.

Photos de microscopie électronique (C) et reconstitution 3D (D) de l'interaction entre mitochondries et RE dans des hépatocytes. Il est important de noter l'association étroite entre le RE (représenté en bleu en D) et la membrane mitochondriale externe (en rose). Les zones opaques aux électrons à cette interface suggèrent que des complexes protéiques pourraient être impliqués dans le pontage entre le RE et les mitochondries. La membrane mitochondriale interne est représentée en jaune, et les cristae en vert. (Figure produite par Dr Carmen Mannela, Albany, NY)

acyltransférase (Rusinol et al., 1994), la diacylglycérol acyltransférase (Rusinol et al., 1994), l'acyl-CoA synthase-4 (Lewin et al., 2001), la protéine de synthèse du glycosylphosphatidylinositol (Vidugiriene et al., 1999) ou la PEMT2. Ces marqueurs des MAMs définissent un micro-domaine du RE associé aux mitochondries. D'autres marqueurs ubiquitaires du RE ne sont pas associés aux mitochondries. Les MAM ont été isolées à partir de différents tissus, cultures cellulaires de mammifères ou de levures (Achleitner et al., 1999; Shiao et al., 1995; Simbeni et al., 1991; Stone and Vance, 2000; Vance, 1990; Vance, 1991). La possibilité de dissocier sur gradient de densité les MAM des mitochondries, confirme que,

bien qu'étroitement associées, les membranes des mitochondries et du RE ne fusionnent pas, ou en des points très ténus.

Côté mitochondrial, des études suggèrent que les zones apposées au RE sont enrichies en contacts entre membranes internes et externes (Ardail et al., 1993; Ardail et al., 1991; Gaigg et al., 1995). Le canal VDAC est enrichi aux zones de contacts entre membranes internes et externes de la mitochondrie mais également aux zones de contacts entre les membranes externes des mitochondries et le RE (Shoshan-Barmatz et al., 2004). Le transporteur de nucléotides ANT et la créatine kinase mitochondriale participent également aux complexes protéiques qui organisent ces zones de contacts (Beutner et al., 1996; Kottke et al., 1994). Une fois encore, cet aspect morphologique des mitochondries est dynamique (Knoll and Brdiczka, 1983). La structure des sites de contacts est variable et leur nombre augmente en présence d'ADP ou d'atractyloside (Bucheler et al., 1991). La surexpression de la créatine kinase dans des souris transgéniques augmente d'un facteur trois le nombre de sites de contacts entre les membranes mitochondriales internes et externes (Rojo et al., 1991; Speer et al., 2005).

Ces différentes approches complémentaires, microscopie électronique, microscopie à fluorescence sur cellules vivantes ou fixées, fractionnement biochimique, montrent qu'un compartiment du RE, enrichi dans une machinerie de signalisation calcique et de synthèse de phospholipides, interagit avec la membrane mitochondriale externe qui est elle-même apposée à la membrane mitochondriale interne. Nous verrons que ces microdomaines où, membrane du RE, membrane interne, et membrane externe des mitochondries sont apposées, permettent une spécialisation fonctionnelle : le transfert de calcium, de nucléotides, et de phospholipides.

Interaction RE-mitochondrie et transfert de la PS

De nombreuses études ont montré que le transport de phospholipides entre les organelles est différent du transport vésiculaire employé par les protéines membranaires et sécrétées. Cela a notamment été montré pour la PC (Kaplan and Pedersen, 1985), la PE (Sleight and Pagano, 1983; Vance, 1991), et la PS (Voelker, 1989b; Voelker, 1990).

La PS est synthétisée par les PSS1 et PSS2, des enzymes présentes dans les MAM et absentes du reste du RE (figure 22). Directement transférée à la mitochondrie, la PS est rapidement décarboxylée par la PSD qui est localisée à la face externe de la membrane interne de la mitochondrie (Percy et al., 1983; Zborowski et al., 1983). L'étape limitante est le transfert des MAMs à la mitochondrie (Voelker, 1989b). L'utilisation de dinitrophénol pour rompre les

interactions entre les membranes internes et externes des mitochondries, s'accompagne d'une diminution du transfert de la PS (Hovius et al., 1992).

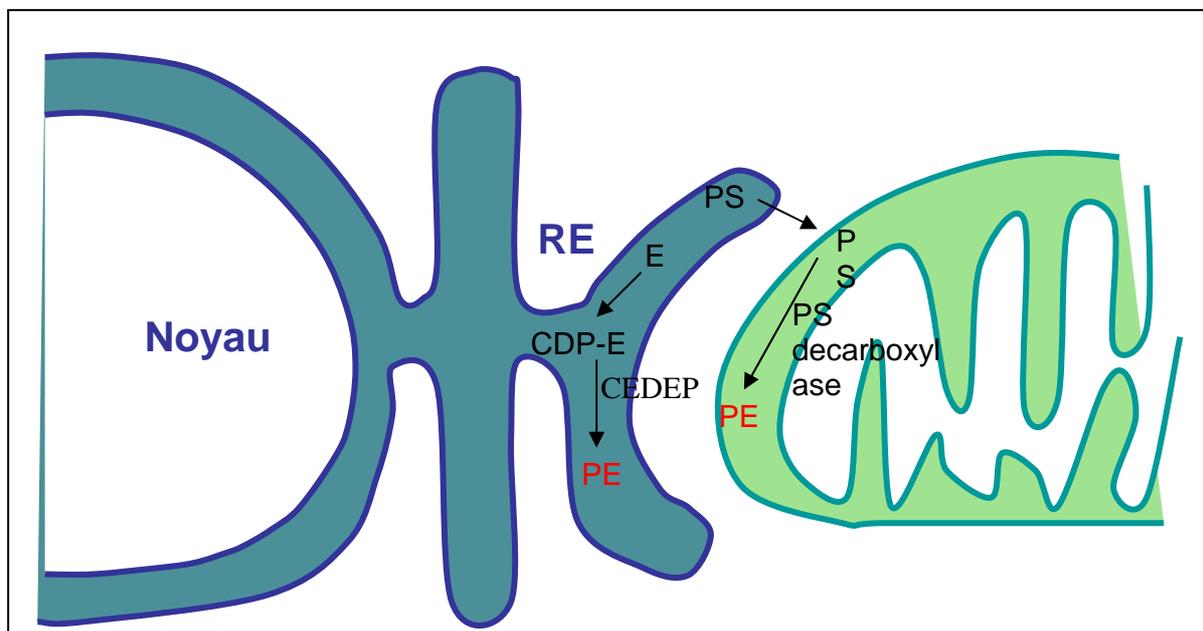


Figure 22 : Représentations schématiques des voies de biosynthèse de la phosphatidyl éthanolamine.

Chez les mammifères deux voies majeures de biosynthèse de la phosphatidylethanolamine (PE) existent.

(A) La voie CDP-éthanolamine ou voie Kennedy (Kennedy, 1956). La réaction finale, catalysée par la CDP-éthanolamine :1,2-diacylglycérol éthanolaminephosphotransférase (CEDEP), a lieu dans le RE où la CDP-éthanolamine (CDPE) est convertie en PE

(B) La voie de décarboxylation de la phosphatidylserine (Borkenhagen, Kennedy, Fielding, 1961). La réaction finale, catalysée par la phosphatidylserine décarboxylase, a lieu à la surface externe de la membrane interne de la mitochondrie et convertit la PS en PE.

Le transport de la PS des mitochondries au RE a été étudié par différentes approches : cellules entières (Trotter et al., 1993; Trotter and Voelker, 1995; Vance, 1990; Vance, 1991; Voelker, 1989b), système de transport reconstitué comprenant des mitochondries et des MAM (Shiao et al., 1998; Shiao et al., 1995; Voelker, 1989b), et cellules perméabilisées (Achleitner et al., 1995; Voelker, 1990; Voelker, 1991; Wu and Voelker, 2001). L'ensemble de ces approches confirme qu'un contact physique, une association étroite entre RE et mitochondrie, est nécessaire pour le transfert de la PS (Achleitner et al., 1999; Simbeni et al., 1990; Simbeni et al., 1991; Vance, 1990; Vance, 1991). La PS qui est décarboxylée en PE, provient d'un pool de PS nouvellement synthétisée, plutôt que de l'ensemble du stock cellulaire de PS, suggérant qu'il existe une compartimentalisation de différents pools de PS dans la cellule (Bjerve, 1985; Vance, 1991). Des expériences de pulse-chase dans des cellules CHO, combinées à des fractionnements subcellulaires, montrent que la PS est transférée des MAM vers la

mitochondrie (Shiao et al., 1995). Lorsque les cellules sont perméabilisées, et que des cellules donneuses, synthétisant de la PS radiomarquée, sont incubées en présence de cellules accepteuses, il n'y a pas de production de PE radiomarquée dans les cellules accepteuses. Ce qui montre qu'un contact étroit entre les MAM, donneuses de PS, et la mitochondrie, accepteuse de PS, est nécessaire (Voelker, 1993).

Dans des cellules de mammifères intactes ou perméabilisées, le transfert de la PS du RE vers les mitochondries requiert de l'ATP (Shiao et al., 1995; Voelker, 1985; Voelker, 1989b; Voelker, 1990). Des expériences où des mitochondries sont traitées à la trypsine montrent que l'import de PS à la mitochondrie nécessite la présence d'une protéine à la membrane externe de la mitochondrie (Shiao et al., 1998). Chez les mammifères, aucun gène impliqué dans le transfert de la PS n'a été identifié. Il existe dans les cellules CHO un mutant du transfert de la PS présentant une activité normale de synthèse de PS et de sa décarboxylation. Mais le cDNA complétant cette mutation n'a pas été identifié (Emoto et al., 1999).

Certains facteurs cytosoliques pourraient réguler le transport de PS du RE vers les mitochondries. L'ajout de S100B recombinante sur des cellules CHO perméabilisées stimule le transfert de PS entre RE et mitochondries. Cet effet de la S100B dépend du calcium et de l'ATP. Il a ainsi été proposé que la S100B augmente les sites de contacts entre le RE et les mitochondries (Vance and Steenbergen, 2005).

Le transfert de la PS du RE à la mitochondrie n'est pas la seule voie qui permette la biosynthèse de PE. Chez les eucaryotes supérieurs, la PE peut également être synthétisée par la voie CDP-éthanolamine (Henneberry et al., 2002; Kennedy, 1956; Vance, 1988). L'importance relative de ces deux voies dépend du type cellulaire. Dans les hépatocytes de rats (Sundler and Akesson, 1975; Tijburg et al., 1989) et dans le coeur de hamster (Zelinski and Choy, 1982), la voie CDP-éthanolamine est le contributeur majeur du pool de PE. Au contraire, dans les cellules CHO, même quand le milieu est supplémenté en éthanolamine, le précurseur de la PE dans la voie CDP-éthanolamine, la décarboxylation de la PS produit plus de 80% de la PE (Kuge et al., 1986; Miller and Kent, 1986; Voelker, 1984).

MAM et tunnel à calcium semblent être une unique et même structure, un micro-domaine du RE étroitement associé aux mitochondries. Ainsi la PSS localisée dans les MAM est régulée par le calcium (Wu and Voelker, 2002).

Si tous les arguments présentés ci-dessus soulignent l'importance des contacts entre le RE et les mitochondries, il n'existe malheureusement pas à ce jour d'étude utilisant des mutants pour perturber cette interaction, et démontrant que la perturbation de cette interaction s'accompagne de la perturbation du transport de PS.

Contacts RE-mitochondries : un micro-domaine à forte concentration calcique

Dans les mitochondries, le potentiel de membrane généré par la chaîne respiratoire, permet l'entrée du calcium à travers la membrane interne via un transporteur électrogénique, l'uniporteur qui n'a jamais été identifié au niveau moléculaire. L'affinité de l'uniporteur pour le calcium est faible, mesurée sur des mitochondries purifiées et isolées, elle est de l'ordre de 10 μM , alors que les concentrations calciques cytosoliques sont de l'ordre de 0.1-2 μM . Cette affinité semble incompatible avec l'accumulation de calcium par les mitochondries à des concentrations calciques physiologiques. Pourtant la mesure des concentrations calciques mitochondriales à l'aide de sondes fluorescentes (Rizzuto et al., 1992) a permis de montrer dans les cellules Hela que la génération d'IP3 s'accompagne d'une augmentation rapide de la concentration calcique dans les mitochondries (Rizzuto et al., 1993) (figure 23 et figure 24). Pour observer une augmentation des concentrations calciques mitochondriales similaires, des cellules perméabilisées à la digitonine doivent être exposées à des concentrations calciques de l'ordre de 5-10 μM , soit 10 à 20 fois supérieures à celles mesurées dans le cytoplasme de cellules stimulées. Si les mitochondries peuvent rapidement incorporer le calcium, c'est dans des zones bien précises, des micro-domaines, à proximité de canaux de la membrane plasmique ou du RE, où le calcium atteint des concentrations nettement plus élevées. Si d'autres sources de calcium peuvent induire une augmentation des concentrations calciques mitochondriales, le calcium en provenance du RE, libéré par l'IP3, reste le plus efficace (Collins et al., 2001). Lorsque sont analysées au niveau subcellulaire les entrées de calcium à la mitochondrie induites par l'activation des récepteurs RyR ou IP3, il existe une hétérogénéité entre les mitochondries, soulignant que seule une fraction des mitochondries est associée au RE, et que la répartition subcellulaire des mitochondries est essentielle, d'un point de vue fonctionnel, à l'entrée du calcium (Drummond et al., 2000; Rizzuto et al., 1998).

Seule une petite fraction du RE est associée aux mitochondries, et dans cette fraction du RE il existe un regroupement en clusters de la machinerie de transfert du calcium : le récepteur à l'IP3 (Jaconi et al., 2000; Mignery et al., 1989; Satoh et al., 1990; Simpson et al., 1997; Simpson et al., 1998; Takei et al., 1992), le récepteur RyR (Sharma et al., 2000), la pompe SERCA (Simpson et al., 1997), et la calréticuline. Il existe donc un véritable tunnel à calcium entre le RE et les mitochondries (figure 24). Le canal VDAC, localisé dans la membrane externe mitochondriale, est enrichi aux interfaces avec le RE et la membrane mitochondriale interne (Shoshan-Barmatz et al., 2004), permet le passage des nucléotides adénines, du calcium, et de nombreux autres métabolites. Il est donc un composant du tunnel entre le RE et

la matrice de la mitochondrie. La surexpression de VDAC augmente ainsi le transfert de calcium entre le RE et les mitochondries (Rapizzi et al., 2002).

Ainsi les pics de concentration calcique observés dans l'espace inter-membranaire mitochondrial sont supérieurs à ceux observés dans le reste du cytosol. Pour le transfert de calcium entre le RE et les mitochondries, certains auteurs parlent de transfert quasi synaptique (Csordas et al., 1999), dans ces micro-domaines le calcium pouvant atteindre des concentrations de l'ordre de 15 μ M, ou plus, 100 μ M au contact des récepteurs IP3 (Neher, 1998). Et seules les concentrations calciques élevées atteintes dans ces micro-domaines semblent pouvoir expliquer les entrées calciques rapides et massives dans les mitochondries.

Les augmentations calciques mitochondriales suite à une libération du calcium par le RE via la stimulation des IP3R ont été montrées dans de nombreux types cellulaires, astrocytes, fibroblastes L929, ostéosarcome143B, hépatocytes primaires (Boitier et al., 1999; Hajnoczky et al., 1995; Rizzuto et al., 1994). Mais la libération du calcium du RE et son accumulation consécutive aux mitochondries peuvent être stimulées par d'autres voies, la voie des récepteurs à la ryanodine dans les cellules musculaires (Brini et al., 1997; Szalai et al., 2000). Ainsi dans les cellules musculaires les variations des concentrations calciques mitochondriales sont aussi rapides que les variations cytosoliques et peuvent avoir des fréquences élevées (Robert et al., 2001; Szalai et al., 2000). Une corrélation entre les variations calciques mitochondriales et les contractions musculaires peut ainsi être observée (Rudolf et al., 2004).

Un stress au RE, comme par exemple une infection par l'hépatite C, induit l'augmentation d'expression d'une forme tronquée de SERCA, S1T, qui s'accumule dans les MAMs (Chami Mounia, 2006). L'accumulation de S1T s'accompagne d'une augmentation des contacts entre le RE et les mitochondries et des flux calciques entre le RE et les mitochondries. Puis les mitochondries gonflent, se dissocient du RE, et entrent en apoptose. L'invalidation de S1T diminue l'induction de l'apoptose. L'utilisation d'un tel mutant confirme que la formation de contact entre le RE et les mitochondries favorise les transferts de calcium.

Homéostasie calcique et contacts RE-mitochondries

Lorsque l'accumulation de S1T s'accompagne d'une augmentation des contacts et des transferts de calcium entre le RE et les mitochondries, il est à noter que la perturbation la plus précoce est la perturbation de la fonction de SERCA, un composant essentiel dans le maintien de l'homéostasie calcique. D'autres expériences suggèrent que l'homéostasie calcique joue un rôle crucial dans la régulation des interactions entre le RE et les mitochondries. Dans les

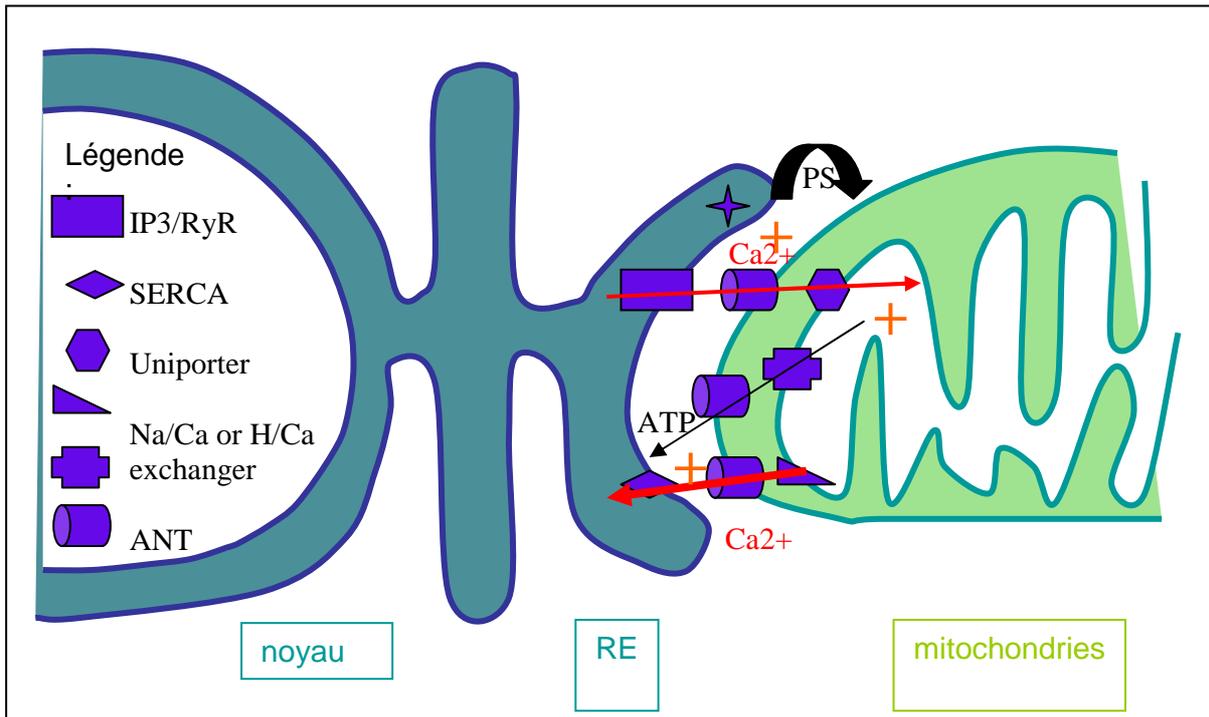


Figure 23 : Représentation schématique des contacts entre RE et mitochondries.

Une fraction du RE, nommé MAM (Mitochondria Associated Membrane) est étroitement associée aux mitochondries dans une zone enrichie en contacts entre membranes mitochondriales externes et internes. Les MAM se définissent par des marqueurs comme la PSS ou l'IP3R. A la mitochondrie, le canal VDAC, pore de la membrane externe, et ANT1, transporteur des nucléotides à la membrane interne, établissent les contacts entre ces membranes.

Ce micro-domaine entre RE et mitochondries est essentiel pour les échanges de calcium, de phosphatidylserine, et de nucléotides entre ces deux organelles. Il existe des interactions entre ces différents transports : les flux calciques du RE à la mitochondrie stimulent (+) le transfert de PS et la synthèse d'ATP à la mitochondrie, la synthèse locale d'ATP par la mitochondrie stimule(+) l'activité de la pompe à calcium du RE : SERCA.

cellules musculaires, l'application d'acétylcholine s'accompagne d'une augmentation calcique cytosolique, et favorise les contacts entre le réticulum sarcoplasmique et les mitochondries (Dai et al., 2005). Même si lors de cette étude il n'a pas été montré que cet effet de l'acétylcholine était directement dépendant du calcium, il a été montré par ailleurs sur une lignée cellulaire MDCK que les interactions entre le RE et les mitochondries sont régulées par les concentrations calciques cytosoliques. A des concentrations inférieures à 100 nM la dissociation est favorisée, tandis qu'à des concentrations supérieures à 1 μ M cette interaction est favorisée (Wang et al., 2000b). Le senseur à calcium qui contrôle ces interactions reste à identifier. Il a été proposé que la S100B régule les sites de contact entre le RE et les mitochondries par une interaction dépendante du calcium avec une cible (Vance and Steenbergen, 2005).

Microtubules et zones de contacts

Ces zones de contact entre le RE et les mitochondries sont régulées et leur superficie augmente par exemple au cours de l'apoptose induite par la céramide C2, favorisant ainsi les transferts de calcium entre la mitochondrie et le RE. Dans ce cas, il existe un lien direct entre la régulation des mouvements des mitochondries le long du réseau de microtubules et la régulation de la superficie de contact entre le RE et les mitochondries. L'activation de CDK5, induit une phosphorylation de la protéine Tau et sa libération des microtubules. Les mitochondries s'accumulent alors autour du centrosome dans une zone périnucléaire où elles forment des contacts avec le RE (Darios et al., 2005).

L'invalidation du moteur moléculaire qui permet le mouvement antérograde des mitochondries le long des microtubules (Tanaka et al., 1998; Wu et al., 1998), ou l'invalidation des protéines adaptatrices Milton (Glater et al., 2006) ou Miro (Guo et al., 2005) qui établissent les contacts entre ce moteur et les mitochondries, induisent une accumulation périnucléaire des mitochondries, dans une zone par ailleurs enrichie en RE. Le réseau de microtubules pourrait donc jouer un rôle crucial dans la régulation des interactions entre le RE et les mitochondries.

La perturbation de l'interaction des mitochondries avec le cytosquelette modifie la proportion des mitochondries qui interagissent avec le RE. Mais cette conséquence peut être indirecte, le pool de mitochondries disponibles est peut-être simplement modifié. Le mécanisme moléculaire qui permet l'interaction entre les mitochondries et le RE reste inconnu. L'interaction s'effectue-t-elle via des protéines adaptatrices qui établissent un pontage entre les mitochondries et le RE, comme certaines images de microscopie électronique peuvent le suggérer, ou cette interaction est-elle générée de façon indirecte par une interaction localisée et contrôlée des mitochondries et du RE avec des composants du cytosquelette ?

Interactions mitochondries-RE et régulation de la signalisation calcique cytosolique

Les mitochondries tamponnent les entrées massives et rapides de calcium, puis libèrent celui-ci de façon progressive et prolongée (Babcock et al., 1997). Aux zones d'apposition entre les mitochondries et le RE, l'entrée du calcium dans les mitochondries limite les augmentations locales en calcium, et ralentit la propagation des vagues calciques comme cela a été montré dans les astrocytes, les cellules à acinus du pancréas, les cardiomyocytes (Boitier et al., 1999; Jaconi et al., 2000; Tinel et al., 1999). De nombreuses études suggèrent que l'entrée du calcium aux mitochondries a un effet important sur la signalisation calcique cytosolique,

« spikes » et oscillations (Babcock et al., 1997; Boitier et al., 1999; Hajnoczky et al., 1999; Ichas et al., 1997; Jaconi et al., 2000; Jouaville et al., 1995; Landolfi et al., 1998; Simpson et al., 1997; Tinel et al., 1999). Si l'entrée massive du calcium dans les mitochondries peut tamponner directement et localement les concentrations calciques cytosoliques proches des mitochondries, s'ajoute à cet effet direct un rétrocontrôle des concentrations calciques sur la probabilité d'ouverture des canaux IP₃ du réticulum (Boitier et al., 1999; Hajnoczky et al., 1999; Jouaville et al., 1995; Landolfi et al., 1998).

Au contraire, dans les cellules Hela, les oligodendrocytes, et les CPO, il a été montré que les mitochondries favorisent la propagation intracellulaire des vagues calciques (Collins et al., 2000; Simpson et al., 1998; Simpson and Russell, 1996). Dans les CPO les sites d'initiation des vagues calciques sont toujours associés avec les mitochondries et régulent la transduction du signal IP₃ (Haak et al., 2002). Dans les astrocytes, les mitochondries, et un microdomaine du RE, défini par des protéines comme la calréticuline et le récepteur à l'IP₃, colocalisent aux sites d'initiation et d'amplification des vagues calciques.

Enfin, dans les cellules β -pancréatiques il a été montré que les mitochondries enrichies aux zones perinucléaires contrôlent l'homéostasie calcique et donc la transcription des gènes nucléaires.

Les interactions entre le RE et les mitochondries jouent donc un rôle clef dans la régulation spatio-temporelle des signaux calciques cytosoliques.

Influence des interactions mitochondries-RE, sur l'homéostasie calcique et le métabolisme mitochondrial

L'augmentation des concentrations calciques mitochondriales s'accompagne d'une augmentation du métabolisme mitochondrial. Des enzymes du cycle de KREBS, NAD⁺-isocitrate déhydrogénase, α -kétoglutarate déhydrogénase, oxoglutarate déhydrogénase et pyruvate déhydrogénase, sont régulées par les concentrations calciques de la matrice (Denton et al., 1980; Hansford and Castro, 1982). Des expériences récentes montrent un couplage direct entre l'activation de l'IP₃R ou du RyR, l'augmentation du transfert de calcium du RE à la mitochondrie, et l'augmentation du métabolisme mitochondrial avec une augmentation des concentrations de NADH et d'ATP (Brandes and Bers, 1997; Hajnoczky et al., 1995; Ichas et al., 1997; McCormack et al., 1990; Pralong et al., 1994; Rizzuto et al., 1994; Robb-Gaspers et al., 1998; Rohacs et al., 1997; Rutter et al., 1996). Les productions de NADH dépendent de la fréquence des oscillations calciques : à basse fréquence correspondent des oscillations de NADH, à haute fréquence l'augmentation de NADH est maintenue et stabilisée.

Aux sites de contact entre le RE et les mitochondries, la production locale d'ATP et l'élimination de l'ADP par la mitochondrie, semblent nécessaires au stockage du calcium par le RE (Kaasik et al., 2001; Landolfi et al., 1998; Saks et al., 2001). L'utilisation de formes mutantes ou délétées de la desmine ou de la protéine LIM ont permis de montrer que les interactions entre les mitochondries et le RE sont essentielles pour le transfert de nucléotides et le bon fonctionnement de la pompe à calcium SERCA (Wilding et al., 2006) (figure 23). L'association entre le RE et les mitochondries s'avère alors cruciale pour une contraction musculaire normale.

RE-mitochondries et apoptose

Le positionnement des mitochondries est essentiel dans l'initiation et la progression de l'apoptose : l'induction de l'apoptose dans les mitochondries n'est pas synchrone (Berridge, 2002; Collins et al., 2002; Lemasters et al., 1998). L'apoptose induite par les céramides, la staurosporine, l'acide arachidonique, ou le stress oxydatif, dépend de la libération du calcium par le RE qui est directement transféré aux mitochondries (Darios et al., 2003; Darios et al., 2005; Muriel et al., 2000; Scorrano, 2003; Szalai et al., 1999). A cela succède une altération de la morphologie des mitochondries : chute du potentiel membranaire, ouverture du complexe protéique PTP (Permeability Transition Pore), rétraction de l'organelle, fragmentation du réseau mitochondrial, rupture de la membrane externe et libération de facteurs apoptogéniques comme le cytochrome C ou AIF (Bernardi et al., 1998; Petit et al., 1998; Petronilli et al., 1994; Skulachev, 1996).

Libération du calcium par le RE

Les concentrations calciques au RE peuvent être réduites par différentes approches : diminution des concentrations extracellulaires en calcium, inhibition de l'ATPase à calcium du RE, surexpression de l'ATPase à calcium de la membrane plasmique, double invalidation de Bax et Bak, surexpression de Bcl2. Quelle que soit l'approche utilisée, si les concentrations calciques du RE sont réduites, la surcharge calcique mitochondriale et les modifications associées disparaissent (Pinton et al., 2000; Pinton et al., 2001; Scorrano, 2003), et l'apoptose est retardée ou abolie. Au contraire si l'ATPase du réticulum sarcoendoplasmique est surexprimée, l'augmentation des concentrations calciques au RE s'accompagne d'une augmentation des entrées calciques à la mitochondrie, d'une apoptose accrue, qu'elle soit spontanée, ou induite par l'acide arachidonique, la C2-céramide, le stress oxydatif (Ma et al., 1999; Scorrano, 2003). La calréticuline est une protéine du RE qui tamponne le calcium, et diminue la réserve de calcium libérable par le RE, sa surexpression s'accompagne d'une mort

cellulaire réduite (Pinton et al., 2001) et son invalidation d'une mort cellulaire accrue (Nakamura et al., 2000). Plus que les concentrations calciques au RE, c'est donc véritablement la libération du calcium par le RE qui est critique.

Transfert du calcium à la mitochondrie

Les flux calciques sont facilités par la connexion physique entre les mitochondries et le RE (Filippin et al., 2003) (figure 19 et figure 23). L'apoptose, qu'elle soit induite par les céramides (Muriel et al., 2000), la surexpression de la protéine MIRO (Fransson et al., 2003), de S1T (GG) ou l'activation de CDK5 (Darios et al., 2005), s'accompagne d'une augmentation des contacts avec le RE qui favorise les flux calciques, et précède le processus de fragmentation mitochondrial. Au contraire l'invalidation de PACS2 aboutit à une dissociation du RE et des mitochondries et une perturbation de l'apoptose médiée par tBid (Simmen et al., 2005).

L'accumulation du calcium aux mitochondries qui résulte de la libération calcique par le RE, et les modifications mitochondriales qui l'accompagnent, ne sont pas de simples effets secondaires de l'apoptose, mais sont de véritables acteurs des voies de signalisations apoptotiques. L'induction de la translocation de Drp1 et sa conséquence sur la fragmentation des mitochondries sont calcium dépendantes (Breckenridge et al., 2003). Le RU-360, un inhibiteur des entrées calciques à la mitochondrie, réduit la libération de cytochrome C et la fragmentation de l'ADN. Au niveau fonctionnel, les zones de contacts entre les membranes internes et externes de la mitochondrie sont des structures importantes pour l'apoptose : VDAC semble limitant dans les flux calciques. La surexpression de VDAC ou de tBid augmente l'entrée de calcium aux mitochondries, ce qui s'accompagne d'une sensibilité accrue à l'apoptose induite par les céramides (Csordas et al., 2002; Rapizzi et al., 2002). Les complexes VDAC-ANT contiennent également du cytochrome C qui peut être libéré en présence de BAX. Les zones de contacts entre membranes internes et externes, constituées de ces complexes protéiques, véritables tunnels à transporter les nucléotides et le calcium, jouent ainsi un rôle essentiel dans la régulation bioénergétique de la cellule, l'homéostasie calcique, et l'apoptose.

Ancrages des mitochondries à des sites spécifiques : d'autres exemples que le RE

Mitochondries et vésicules de sécrétion

Dans les cellules chromaffines, ou les cellules des acini pancréatiques, les augmentations de concentrations calciques ne sont pas identiques dans toutes les mitochondries, mais cette augmentation dépend de leur localisation (Montero et al., 2000; Park et al., 2001; Straub et al., 2000; Tinel et al., 1999). Le couplage entre les flux calciques mitochondriaux et le métabolisme ont des conséquences fonctionnelles importantes pour la sécrétion. Cela a notamment été montré pour la sécrétion d'insuline dans les cellules β -pancréatiques (Kennedy and Wollheim, 1998; Maechler et al., 1998; Rutter and Rizzuto, 2000). La sécrétion d'insuline dépend du glutamate (Maechler et al., 1999) et de l'ATP (Pagliarini et al., 2005), dont la synthèse dépend elle-même des concentrations calciques mitochondriales. Ainsi les formes de diabète d'hérédité maternelle résultent de mutations dans l'ADN génomique mitochondrial maternel. Par ailleurs, c'est dans les mitochondries des cellules chromaffines, localisées à proximité des vésicules de sécrétion, que les augmentations calciques mitochondriales les plus fortes ont été décrites, jusqu'à 500 μ M. L'inhibition de la séquestration du calcium par les mitochondries induit une augmentation nette de la sécrétion de catécholamines par ces cellules (Montero et al., 2000).

Le positionnement des mitochondries contrôle la diffusion des ions calciques à travers la cellule. Dans les cellules pancréatiques des acini, trois populations distinctes peuvent être mises en évidence : les mitochondries périnucléaires, les mitochondries au contact de la membrane plasmique dans la zone basolatérale, les mitochondries qui séparent les granules apicaux du cytosol basolatéral. Chacune de ces populations est activée indépendamment par une signalisation calcique spécifique (Park et al., 2001). Une population de mitochondries est localisée de façon stratégique à proximité de la région granulaire pour éviter la propagation de la vague calcique du pôle de sécrétion vers les régions basolatérales (Straub et al., 2000; Tinel et al., 1999). Dans ces cellules, si les mitochondries de la ceinture périnucléaire n'empêchent plus la diffusion des vagues calciques vers la zone basale et le noyau, alors le profil d'expression des gènes s'en trouve perturbé.

Dans les cellules des acini de la glande thyroïdienne, d'autres cellules spécialisées dans la sécrétion, la répartition des mitochondries est complètement différente. Contrairement aux cellules pancréatiques, il n'y a pas de ceinture mitochondriale périgranulaire. En conséquence, dans ces cellules la vague calcique n'est pas restreinte aux zones apicales, et se propage

jusqu'à la membrane basolatérale, où elle régule l'ouverture des canaux potassiques dépendants du calcium (Bruce et al., 2004).

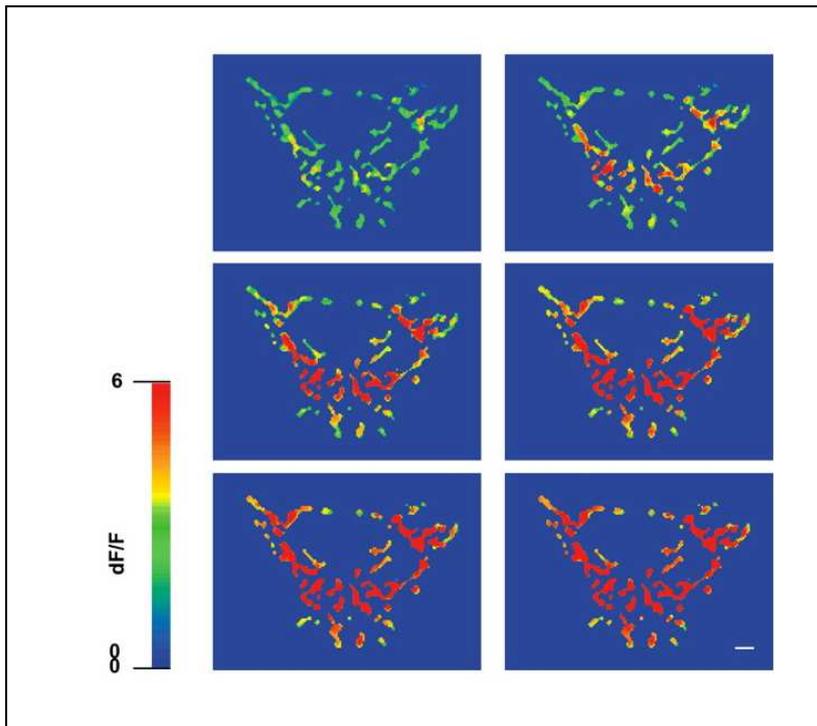


Figure 24 : La réponse des mitochondries aux signalisations calciques est aussi hétérogène que leur localisation.

Sur l'échelle représentée à gauche des images, le bleu représente les faibles concentrations calciques, tandis que le rouge intense représente les concentrations élevées. Cette échelle est utilisée pour visualiser les concentrations calciques mitochondriales dans des cellules Hela. L'image localisée en haut à gauche a été prise 0,5 s après l'application d'histamine, les images suivantes sont prises toutes les secondes. Il est important de noter que les entrées de calcium varient d'une population mitochondriale à l'autre. (d'après Rizzuto and Pozzan, 2006).

Mitochondries et membranes plasmiques

L'association étroite entre les mitochondries et la membrane plasmique semble importante pour le contrôle des entrées de calcium et la régulation spatiotemporelle de son augmentation dans le cytosol (Hoth et al., 1997; Lawrie et al., 1996; Montero et al., 2000; Peng and Wang, 2000). Dans les cellules musculaires, comme cela a été montré par la surexpression des protéines Hfis1 et Drp1, les mitochondries au contact de la membrane plasmique régulent l'activité ATPase à calcium de cette membrane (Frieden et al., 2005). Une réponse mitochondriale rapide aux augmentations calciques dans les micro-domaines sous la membrane plasmique n'a pas seulement été observée dans les cellules excitables, mais

également à proximité des canaux CRAC, où l'élimination du calcium par les mitochondries aurait un rôle de rétrocontrôle sur l'ouverture des canaux (Gilabert and Parekh, 2000; Hoth et al., 1997).

Mitochondries et synapses

Dans les cellules neurales après stimulation, les mitochondries localisées dans les zones présynaptiques tamponnent dans un premier temps les augmentations brusques et intenses de calcium. Puis libèrent ultérieurement de façon régulière et continue le calcium par l'échangeur Na/Ca (Hoth et al., 1997; Yang et al., 2003). Un phénomène crucial, dont l'inhibition empêche la potentialisation synaptique induite par un tétanus (Yang et al., 2003). La localisation des mitochondries aux zones présynaptiques ne contrôle pas seulement l'homéostasie calcique à court terme après stimulation (Guo et al., 2005), à long terme et en conséquence la potentialisation synaptique (Tang and Zucker, 1997; Yang et al., 2003), mais contrôle également : la morphologie (Guo et al., 2005), le nombre, et la plasticité des synapses (Li et al., 2004).

Dans les cellules neurales, comme cela a été montré pour plusieurs mutants, DRP1 (Verstreken et al., 2005), dMIRO (Guo et al., 2005), la suppression des mitochondries localisées dans les zones pré-synaptiques s'accompagne, outre d'une augmentation transitoire du calcium plus intense après stimulation, d'une diminution de la quantité de vésicules de neurotransmetteurs libérées. L'ajout d'ATP restaure ce dernier phénotype, ce qui montre que la production locale d'ATP par les mitochondries est cruciale pour le bon fonctionnement synaptique.

La localisation des mitochondries à la synapse est donc essentielle pour le contrôle de l'homéostasie calcique et de la synthèse d'ATP.

Adressage des protéines à la mitochondrie

Introduction

Les mitochondries sont des reliques des bactéries qui vivaient en endosymbiose dans le cytoplasme des eucaryotes ancestraux. Au cours de l'évolution, la plupart des gènes originellement codés par le génome de la bactérie endosymbiote ont été transférés vers l'ADN nucléaire (Andersson et al., 1998). Différentes approches suggèrent que la mitochondrie de mammifère contient environ 1200 protéines (Andersson et al., 1998; Kumar et al., 2002; Lopez et al., 2000; Rabilloud et al., 1998). Le génome mitochondrial code pour 13 polypeptides seulement. Ainsi la majorité des protéines mitochondriales, 99%, sont encodées

par l'ADN génomique nucléaire. Différents systèmes d'adressage et de transport des protéines dans les différents compartiments de la mitochondrie se sont développés au cours de l'évolution. 50% des protéines mitochondriales sont synthétisées sans séquences N-terminales clivables. C'est le cas de la totalité des protéines de la membrane externe, de la majorité des protéines de l'espace inter-membranaire, et d'une partie des protéines de la membrane interne.

Protéines de la matrice et de la membrane interne:

Classification

Les protéines de la membrane interne possèdent des topologies variées : elles possèdent un ou plusieurs segments transmembranaires. Indépendamment de leurs structures topologiques, les protéines de la membrane interne peuvent être classifiées en trois catégories, suivant leur origine évolutive. La première classe correspond à des protéines synthétisées à l'intérieur de la mitochondrie. Elles ont un fort taux d'identité avec les protéines procaryotes et leurs gènes proviennent du génome ancestral des bactéries endosymbiotes. La deuxième classe contient des protéines qui n'ont pas d'équivalent procaryote et sont encodées dans le génome nucléaire. Ces protéines ne possèdent pas de signal d'adressage N-terminal, mais sont adressées à l'aide de boîtes internes. La troisième classe comprend des protéines qui ont des homologues procaryotes, mais sont codées par des gènes nucléaires, ces protéines possèdent un signal d'adressage en N-terminal, typiquement sous la forme d'une préséquence N-terminale clivable.

Première catégorie

Les protéines encodées par le génome mitochondrial s'intègrent dans la membrane interne depuis la matrice dans un processus similaire à celui des protéines de la membrane plasmique bactérienne (Herrmann et al., 1995; Stuart et al., 1996). Cette insertion n'est pas nécessairement couplée à leur synthèse (Herrmann et al., 1995; Rojo et al., 1995). Ces protéines présentent une répartition des charges en acides aminés typique: les résidus sont chargés positivement côté matrice, tandis que les segments de l'espace inter-membranaire portent principalement des charges négatives (Gavel and von Heijne, 1992). Cette répartition est similaire à celle observée pour les protéines cytoplasmiques bactériennes.

Deuxième catégorie

Cette classe comprend notamment les différentes composantes du système d'import, quelques sous-unités non catalytiques de la chaîne respiratoire, et de nombreuses translocases à

substrats et nucléotides. Pour ces protéines, l'import peut être décrit par cinq étapes comme pour le transporteur de métabolites (Rehling et al., 2004). Après synthèse sur des ribosomes cytosoliques libres, les précurseurs hydrophobes sont protégés de l'agrégation par des chaperonnes cytosoliques (étape I). Ces précurseurs sont reconnus par les récepteurs TOM à la surface de la mitochondrie (étape II). Après translocation ces précurseurs sont pris en charge par des protéines chaperonnes de l'espace inter-membranaire: le complexe des petites protéines Tim9-Tim10 empêche l'agrégation des protéines hydrophobes (étape III) (Curran et al., 2002; Koehler, 2004; Lu et al., 2004; Mesecke et al., 2005), le complexe Mia 40-Erv1 contrôle l'état redox des cystéines (Mesecke et al., 2005; Naoe et al., 2004; Rissler et al., 2005). La structure de ce complexe est aujourd'hui finement décrite (Webb et al., 2006). Le complexe Tim 22 permet l'insertion du précurseur dans la membrane interne, dans un processus dépendant du potentiel de membrane delta-psi (étape V), c'est pourquoi la répartition des charges pour ces protéines est spécifique (Gavel and von Heijne, 1992). Les protéines sont directement incorporées dans la membrane interne sans passer par la matrice.

Troisième catégorie

Les protéines de la troisième classe possèdent des préséquences N terminales clivables, dont la longueur et la composition en acides aminés sont variables. Cependant toutes comportent une charge nette positive, et forment une hélice amphipatique (Maarse et al., 1994; Roise et al., 1988; Ryan et al., 1994). Ces protéines traversent les membranes comme des polypeptides linéaires : la membrane externe à l'aide de la translocase de la membrane externe (TOM), et la membrane interne à l'aide de la translocase Tim23. Au niveau de Tim23, deux trajets distincts sont possibles. Dans le premier cas, la translocation au travers du complexe Tim23 est stoppée par un segment transmembranaire hydrophobe, et la protéine est libérée latéralement dans la membrane interne. Dans le second, les protéines sont d'abord transloquées dans la matrice avec la protéine PAM (Presequence translocase Associated Motor), processus dépendant du potentiel de membrane et de l'hydrolyse de l'ATP, puis seulement sont insérées dans la membrane interne à l'aide de protéines comme Oxa1, dans un processus similaire à celui observé pour les protéines bactériennes de la membrane plasmique.

Membrane externe

Aucune protéine décrite à ce jour ne possède de séquence N-terminale clivable. Le complexe Tim9-Tim10 qui joue le rôle de chaperonne dans l'espace inter-membranaire n'est pas uniquement utilisé pour des protéines de la membrane interne, mais sert également au transfert des protéines avec des motifs feuilletés adressées à la membrane externe, qui passent

successivement du complexe TOM, membrane externe, au complexe Tim9-Tim10 espace inter-membranaire, au complexe SAM, pour l'insertion finale dans la membrane externe.

Protéines de l'espace inter-membranaire:

Toutes les protéines de l'espace inter-membranaire sont codées par le génome nucléaire, mais il existe différents mécanismes d'import. Certaines protéines de l'espace inter-membranaire comportent des séquences d'adressage à la matrice suivies de séquences hydrophobes (Hartl et al., 1987). Ces protéines comportant des préséquences bipartites sont adressées à la membrane interne avant d'être clivées par protéolyse, ce qui libère la protéine mature soluble dans l'espace inter-membranaire (Glick et al., 1992). Ce mode d'import avec une séquence bipartite est principalement utilisé pour les protéines de poids moléculaire élevé, et l'import transitoire à la membrane interne est médié par le complexe Tim23. Un second mode d'adressage est décrit : suite à la translocation au travers de la membrane externe via TOM, les protéines solubles sont libérées directement dans l'espace inter-membranaire.

Traduction localisée

Des expériences conduites par Butow de 1972 à 1975 ont montré qu'une catégorie de ribosomes cytosoliques est accrochée à la surface des mitochondries. Il a récemment été montré par des approches de puces qu'environ 50% des ARNm codant pour des protéines mitochondriales sont associés à des polysomes fixés aux mitochondries. Ces ARNm sont généralement des ARNm de classe II, d'origines procaryotes, tandis que les ARNm de classe I, d'origines eucaryotes, sont traduits sur des polysomes libres. Cette approche a été validée *in vivo* par des marquages GFP (Marc et al., 2002), des expériences qui montrent l'importance des séquences 3'UTR dans l'adressage des ARNm à la mitochondrie (Marc et al., 2002; Margeot et al., 2005). Le retrait du domaine UTR empêche la traduction localisée de l'ARNm, mais pas l'import de la protéine à la mitochondrie. Si cette traduction localisée n'est pas indispensable, ce système a sans doute été sélectionné lors de l'évolution pour favoriser un adressage des protéines à la mitochondrie plus efficace et rapide.

La traduction localisée est par ailleurs un moyen efficace pour introduire de la variété dans le protéome mitochondrial en fonction de la localisation subcellulaire des mitochondries. Certains ARNm, en fonction de séquences d'adressage dans leurs domaines UTR, pourraient être adressés aux mitochondries périphériques, tandis que d'autres seraient préférentiellement adressés aux mitochondries péri-nucléaires.

La famille AAA

Définition

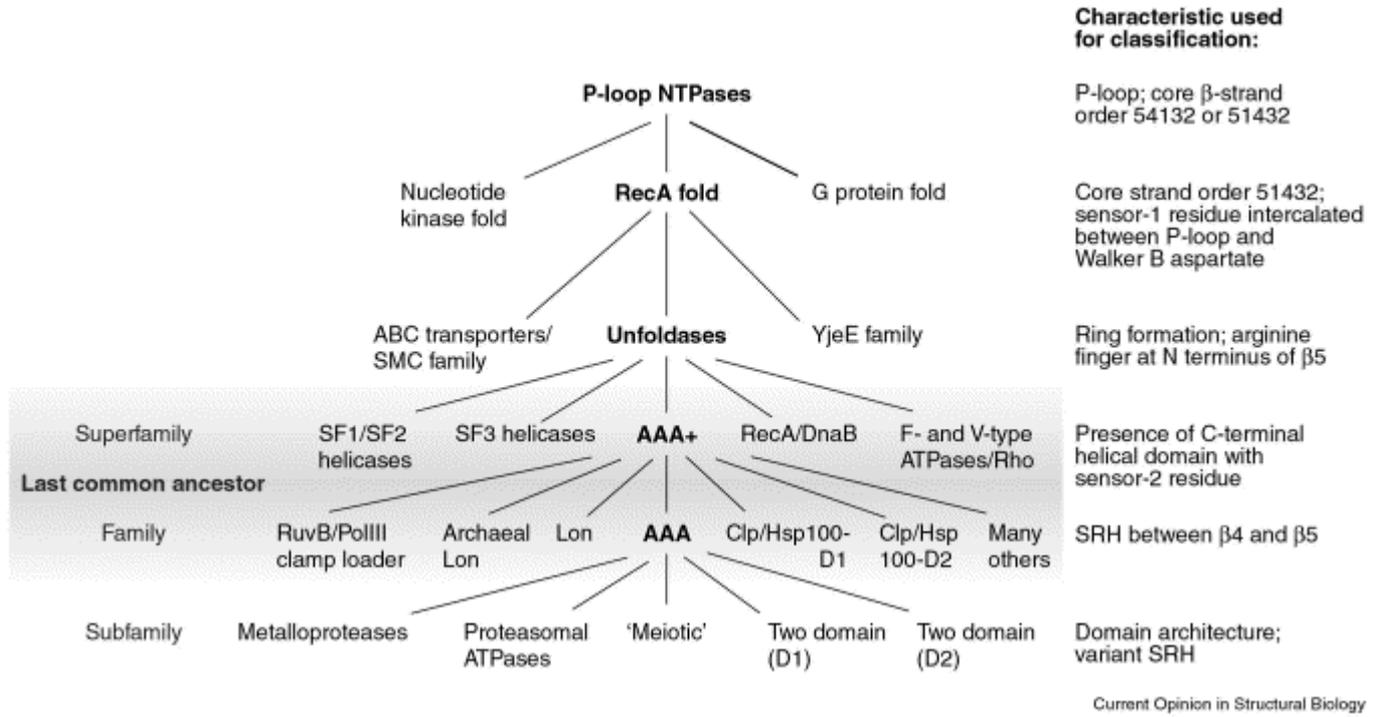


Figure 25 : Classification phylogénétique du domaine AAA parmi les autres NTPases à « P-loop ». Les critères de classification utilisés à chaque nœud sont représentés sur la droite (D'après Lupas and Martin, 2002).

La famille AAA (ATPases Associées à des Activités variées) a été décrite pour la première fois par Erdmann et al. en 1991. Comme leur nom l'indique, ces protéines sont impliquées dans de nombreuses fonctions : dégradation des protéines, maturation des complexes membranaires, régulation de l'expression des gènes, fusions membranaires, assemblage des microtubules.

La famille AAA appartient à la super famille des P-loop NTPases (figure 25). En addition des motifs Walker A et Walker B classiques, les membres de la famille AAA contiennent un domaine très conservé, nommé SRH (Second Region of Homology) (figure 26), impliqué dans l'oligomérisation des protéines (Ammelburg et al., 2006; Erzberger and Berger, 2006; Frickey and Lupas, 2004; Hanson and Whiteheart, 2005; Lupas and Martin, 2002).

Structure

L'architecture des protéines AAA consiste en un domaine N terminal, site de fixation des substrats, auquel succède un ou deux domaines ATPases (nommés D1 et D2) (figure 26). Il

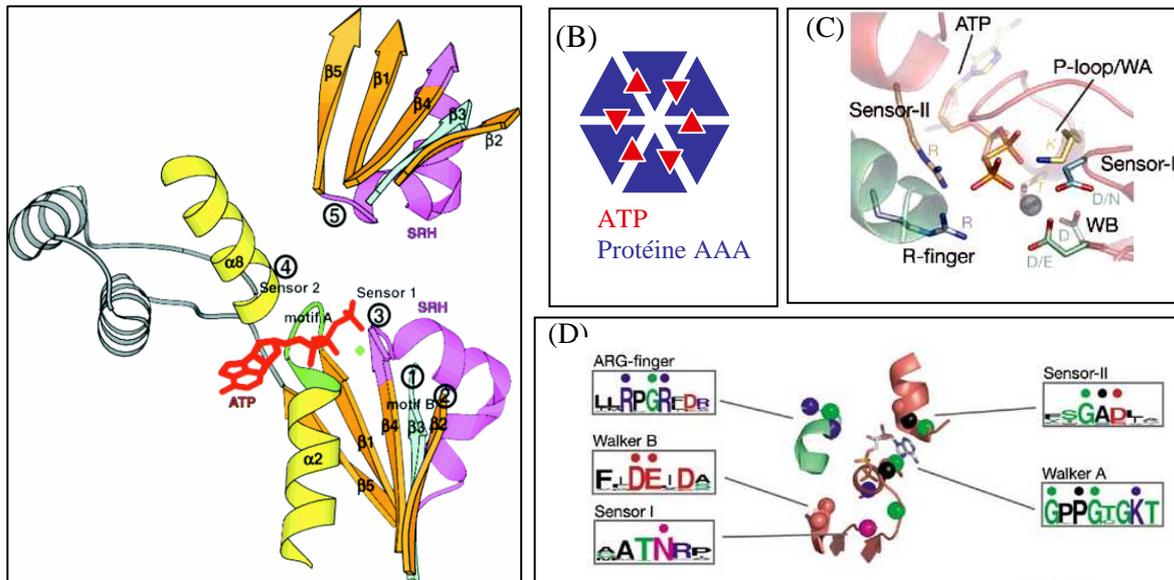


Figure 26 : Structure des protéines AAA

(A) Représentation schématique en ruban du site de fixation de l'ATP dans la famille AAA. L'ATP se fixe à l'interface entre deux monomères (d'après Lupas). Ainsi toutes les protéines AAA décrites à ce jour sont présentes sous la forme d'un hexamère (B).

(C) Représentation détaillée du site de fixation de l'ATP dans la famille AAA. L'ATP, ainsi que les motifs clés impliqués dans la fixation de l'ATP sont représentés : sensor I, sensor II, doigt arginine (R-finger), Walker A (WA) et

B (WB) (d'après Erzberger et Berger, 2006).

(D) Conservation des motifs impliqués dans la fixation et l'hydrolyse de l'ATP. La conservation des résidus est proportionnelle à la taille des lettres.

semblerait que l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP soit convertie en énergie mécanique pour le désassemblage et le « defolding » de complexes protéiques substrats.

De nombreuses structures cristallographiques ont été obtenues (figure 26), comme pour p97 (DeLaBarre and Brunger, 2003; Huyton et al., 2003; Zhang et al., 2000) ou NSF (Lenzen et al., 1998; Yu et al., 1998).

Toutes les AAA pour lesquelles l'oligomérisation a été investiguée forment des hexamères (Frickey and Lupas, 2004; Frohlich, 2001; Lupas and Martin, 2002), bien que dans certains cas, comme pour la katanine, les dimères ne s'assemblent en hexamères que lorsque fixés sur les microtubules (Hartman and Vale, 1999). Les structures montrent que dans ces oligomères arrangés en anneaux, le site de fixation de l'ATP est à l'interface de deux sous-unités : le domaine SRH d'une sous-unité projette un résidu Arginine (Arg finger) dans la poche à nucléotide de la sous-unité suivante. L'importance de ce domaine SRH dans la fixation et l'hydrolyse de l'ATP explique la forte conservation de ce domaine dans la famille AAA.

Phylogénie

La famille AAA peut être décomposée en 5 branches principales : sous-unités du protéasome, métalloprotéases, D1 et D2, BCS1, et le groupe « Méiotique », qui comprend notamment la katanine, la spastine et MSP1. Tous les représentants du groupe BCS1 décrits à ce jour sont uniquement présents dans des organismes eucaryotes, tandis que ceux du groupe métalloprotéases ne sont représentés que dans des organelles ou des bactéries (figure 27). Les représentants des groupes : sous-unité du protéasome, D1 et D2, « méiotique », ont des représentants à la fois chez les eucaryotes et les procaryotes.

Il est important de noter que les hexamères de protéines AAA fonctionnent rarement seuls, mais appartiennent généralement à des macro-complexes protéiques, essentiels dans la spécification de leurs fonctions, notamment dans l'interaction des protéines AAA avec leurs substrats (Dougan et al., 2002; Dreveny et al., 2004; Mogk and Bukau, 2004; Sauer et al., 2004).

Les relations entre les différents membres de la famille AAA peuvent être également construites en fonction de l'identité de leur domaine N-terminal. Ces analyses de séquences

peuvent s'avérer plus informatives pour prédire la fonction d'une protéine inconnue, en effet ce domaine N-terminal est spécifiquement impliqué dans la fixation des substrats, contrairement au cœur du domaine AAA qui est lui partagé par toutes les protéines AAA impliquées dans des fonctions très variées.

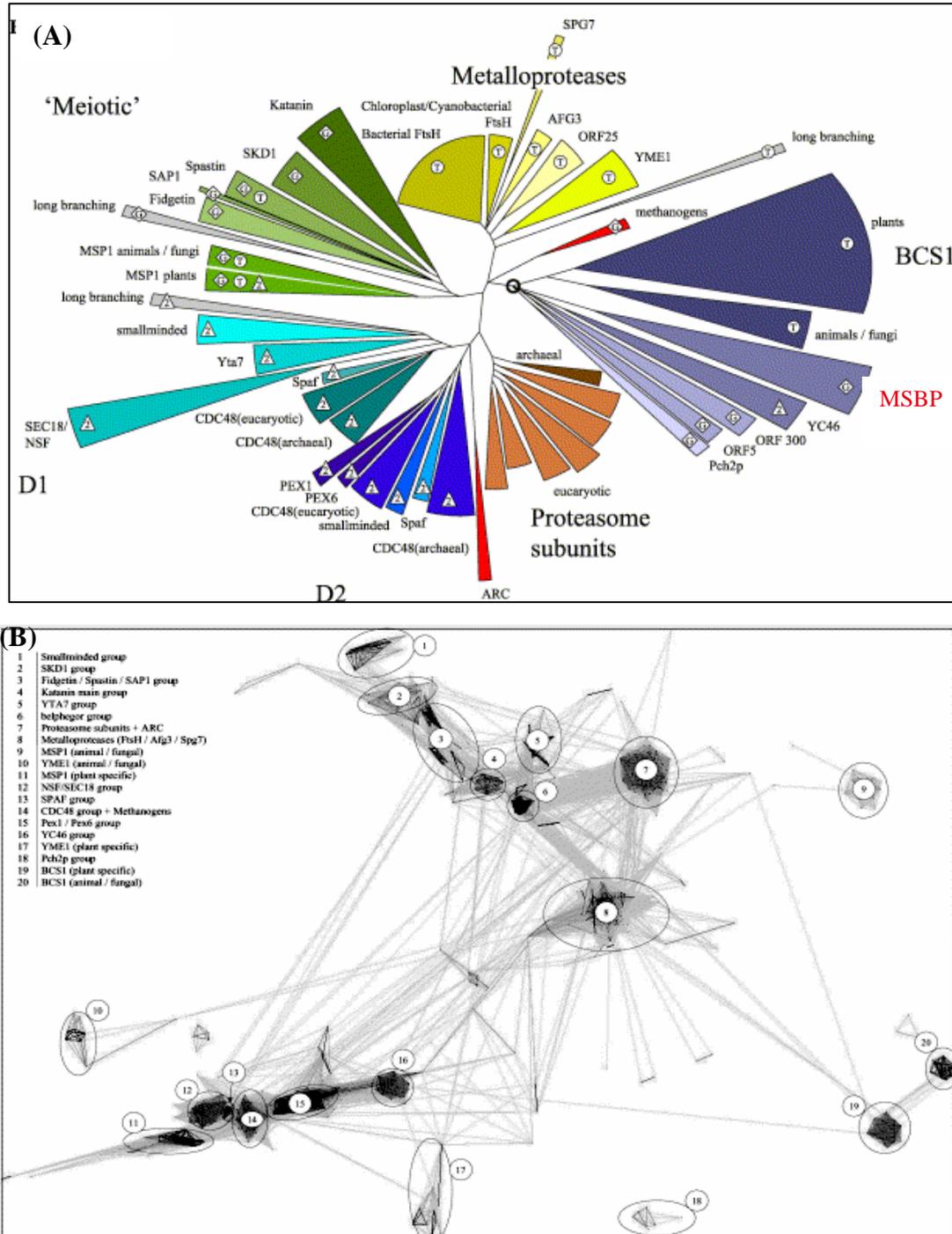


Figure 27 : Relations phylogéniques dans la famille AAA

(A) Phylogénie du domaine AAA. La longueur et l'angle de chaque clade reflètent la longueur de branche maximale (divergence maximale) et le nombre de séquences qui appartient à ce clade. La racine de cet arbre est représentée par le cercle noir, les clades mineurs dont la branche est longue et dont la monophylie est

incertaine sont colorés en gris. La lettre T indique les clades qui contiennent un domaine transmembranaire dans leur séquence N-ter, la lettre G les clades contenant un domaine SRH porteur d'une délétion, et le chiffre 2 les clades qui contiennent deux domaines SRH. Il est à noter que le clade MSBP (noté ici Belphegor) appartient à un clade isolé (D'après Frickey and Lupas, 2004).

(B) Comparaison des domaines N-ter de la famille AAA. Les domaines N-ter de la famille AAA correspondent aux sites de fixation des substrats. L'analyse de ce domaine montre que les protéines les plus proches de MSBP sont les familles de la katanine et la spastine, deux familles de protéines capables d'interagir avec les microtubules (Frickey et Lupas, 2004).

Tumeurs gliales

Classification des tumeurs gliales

L'analyse des tumeurs commence par leur classification, qui est essentielle pour le choix du traitement. De manière classique, en anapathologie, les tumeurs sont classées en fonction de leur ressemblance relative aux types cellulaires normaux du système nerveux central. Les gliomes sont classés en différents groupes : astrocytomes (60-70% des gliomes), oligodendrogliomes (5-30% des gliomes) et épendymomes (plus de 10 % des gliomes) (Kleihues and Ohgaki, 2000; Kleihues et al., 1995). Les oligodendrogliomes sont parmi les tumeurs solides les plus chimiosensibles (Perry et al., 1999), contrairement aux glioblastomes (Astrocytomes de grade 4 d'après la World Health Organisation), qui, malgré une ablation chirurgicale et une radiothérapie focale, continuent à conserver un mauvais pronostic de survie avec une médiane de survie de 12 mois (Carpentier, 2005). Ainsi les oligodendrogliomes répondent mieux à la chimiothérapie que les astrocytomes d'un grade similaire (Cairncross and Macdonald, 1988; Cairncross et al., 1998). Dans ce dernier cas les chimiothérapies avec la nitrosourée sont sans effets substantiels sur la survie excepté dans certains sous-groupes. Les glioblastomes multiformes sont les tumeurs du système nerveux les plus malignes (Ashby and Shapiro, 2004; Gilbertson, 2006; Mischel et al., 2004; Rao and James, 2004; Stern and Raizer, 2006).

Cependant ce type de classification s'avère faillible pour pronostiquer l'évolution de la tumeur. Si le type de tumeur dépend en partie du type cellulaire dont elle dérive, la morphologie des cellules tumorales peut être très différente de la morphologie des cellules originelles, et la combinaison de mutations génétiques à l'origine de la transformation cellulaire est également importante dans l'identité tumorale. Pour améliorer le traitement des patients, il est donc nécessaire d'introduire des critères de classification plus détaillés que ceux classiquement utilisés en anapathologie.

Ainsi, l'utilisation de puces permet également de classifier les tumeurs en fonction du profil d'expression des gènes, et cette approche est de plus en plus utilisée (French et al., 2005; Fuller et al., 1999; Mischel et al., 2004; Mukasa et al., 2002; Nutt et al., 2003; Shai et al., 2003; Watson et al., 2001a). En revanche, malgré l'intérêt qui a été porté un temps aux facteurs de transcription Olig1 et Olig2, ces marqueurs se révèlent des marqueurs peu probants de classification des oligodendrogliomes comparés aux astrocytomes et aux glioblastomes (Bouvier et al., 2003; Lu et al., 2001). La méthylation des îlots CpG pourrait également s'avérer un critère de classification prometteur, elle peut être spécifique de certains

gènes comme p16/INK4 (Costello et al., 1996; Merlo et al., 1995), et semble d'autant plus intéressante que ces modifications apparaissent de façon très précoce au cours du processus de transformation, alors que les changements génomiques sont encore peu fréquents (Costello, 2003; Fruhwald et al., 2001). Mais ces résultats restent préliminaires, et ne sont pas encore fructueux pour la classification des tumeurs.

Perte d'hétérozygotie au locus 1p et développement des oligodendrogliomes

Les pertes d'hétérozygotie concernant les loci 1p et 19q, caractéristiques des oligodendrogliomes comparés aux astrocytomes, s'avèrent un critère de classification assez précis, et apparaissent actuellement comme les plus efficaces. Elles permettent de prédire la réponse de la tumeur au traitement : elles sont chimiosensibles (Ino et al., 2001; Ino et al., 2000; Jeuken et al., 2001; McDonald et al., 2005; Ohgaki and Kleihues, 2005; Reifenberger et al., 1994; Smith et al., 2000; Stupp et al., 2006; Watson et al., 2001b). Outre les oligodendrogliomes (Cairncross et al., 1998; Ino et al., 2001; Schmidt et al., 2002), certains glioblastomes, caractérisés par la perte du 1p, s'avèrent également chimiosensibles (Ohgaki and Kleihues, 2005; Schmidt et al., 2002). Ces tumeurs restent chimiosensibles, ce qui suggère que les cellules qui constituent une telle tumeur portent un génotype qui rend la tumeur incapable d'évoluer vers la résistance. Les études les plus récentes pour caractériser les pertes d'hétérozygotie 1p utilisent non plus l'hybridation in situ mais les PCR génomiques sur les séquences microsatellites.

La délétion du locus 1p suggère que cette région porte des gènes suppresseurs de tumeurs.

Si la transformation cellulaire peut parfois être induite par l'altération d'un ou deux oncogènes (Bhakoo et al., 1996; Ridley et al., 1988), le processus à l'origine du développement d'oligodendrogliomes, caractérisés par la perte du locus 1p, semble beaucoup plus complexe. Les tentatives pour cartographier une zone minimale de délétion se sont avérées infructueuses, les résultats des différentes études sont contradictoires, et lorsque la délétion cartographiée est trop restreinte, contrairement aux pertes d'hétérozygotie 1p plus classiques, qui sont étendues, les tumeurs sont résistantes (Dong et al., 2004; Husemann et al., 1999; Iuchi et al., 2002; Smith et al., 2000). Au vu de l'étendue de la délétion, de nombreux gènes sont donc impliqués dans la transformation cellulaire.

Hétérogénéité cellulaire des astrocytomes

Même si plus de 65% des astrocytomes de grades peu avancés présentent une mutation TP53 (Kleihues and Ohgaki, 2000), les astrocytomes correspondent à un groupe de tumeurs plus hétérogènes que les oligodendrogliomes. La signature génétique la plus fréquente dans les glioblastomes est l'amplification du récepteur EGFR, mais sont également observées des mutations dans p53, p16, MYC, PDGF et des pertes d'hétérozygotie au locus 10q (Ohgaki et al., 2004; Rao and James, 2004).

L'expression d'un mutant Ras constitutivement actif dans les astrocytes (Ding et al., 2001), l'inactivation de p16/INK4 ou p19/ARF dans les astrocytes et les progéniteurs neuraux (Uhrbom et al., 2002), l'expression d'un récepteur EGF constitutivement actif dans des cellules invalidées p16/INK4 et p19/ARF (Bachoo et al., 2002) aboutissent au développement d'astrocytomes de hauts grades ; ce qui montre que différentes voies peuvent aboutir au développement de telles tumeurs.

Une des limites dans l'utilisation de marqueurs moléculaires dans les astrocytomes est l'hétérogénéité cellulaire à l'intérieur même de la tumeur. Même dans les astrocytomes de grades peu avancés une hétérogénéité dans les caryotypes peut être observée (coons et al., 1995). Dans les astrocytomes de grades avancés l'hétérogénéité cellulaire est considérable (Loeper et al., 2001; Misra et al., 2000; Shapiro and Shapiro, 1984; Shuangshoti et al., 2000). L'hypothèse actuellement retenue est qu'un petit nombre de cellules au sein de la cellule ont des caractéristiques de cellules souches, ce qui expliquerait l'hétérogénéité cellulaire observée (Ignatova et al., 2002; Loeper et al., 2001).

Oligodendrogliomes : cellules originelles et expression du marqueur S100B

Certaines études suggèrent que l'origine cellulaire pourrait parfois être plus importante que les oncogènes surexprimés ou les suppresseurs de tumeurs invalidés. Ainsi, le récepteur EGFR, généralement amplifié dans les glioblastomes, lorsqu'il est surexprimé sous un promoteur S100B, fortement exprimé dans les cellules progénitrices oligodendrogliales, donne lieu au développement de tumeurs aux caractéristiques oligodendrogliales (Weiss et al., 2003). L'origine cellulaire semble donc cruciale dans l'identité de la tumeur qui se développe.

L'expression de la protéine S100B est donc fortement recrutée dans les cellules d'où peuvent dériver les oligodendrogliomes, et par ailleurs, les gènes de deux cibles de la S100B, MSBP1 et MSBP2, sont sur le locus 1p36.33 qui est délété dans les oligodendrogliomes. Nous nous sommes donc intéressés au statut des protéines MSBP1 et MSBP2 et de leurs gènes correspondants dans les oligodendrogliomes. Nous montrons ici à l'aide de biopsies de tumeurs que la protéine MSBP2 est un marqueur négatif des oligodendrogliomes comparés aux glioblastomes. Dans la lignée cellulaire HS683, dérivée d'un oligodendrogliome, nous montrons que l'absence d'expression de la protéine MSBP2 résulte de la délétion homozygote du gène. Bien plus, l'invalidation de l'expression des gènes MSBP par siRNA, contrairement à leurs surexpressions, favorise la prolifération des cellules U373, et leur croissance indépendamment de l'ancrage en soft agar. Ces résultats suggèrent que l'invalidation de l'expression du gène MSBP2 pourrait participer à la transformation cellulaire.

Résultats

**Identification et caractérisation comme
cible de la S100B d'une protéine impliquée
dans la distribution subcellulaire des
mitochondries**

Identification d'une cible mitochondriale de la S100B : une nouvelle protéine, MSBP

Il a été décrit que la S100B s'accumule de façon transitoire lors de la maturation des cellules progénitrices oligodendrogiales (CPO) (Deloulme et al., 2004; Hachem et al., 2005). Pour analyser la pertinence de ce modèle cellulaire et pour identifier une cible mitochondriale de la S100B, la distribution subcellulaire de la S100B a été analysée plus en détail dans une culture secondaire de CPO de rat en prolifération par une approche d'immunofluorescence en utilisant différents types de perméabilisation (figure 28A). Les CPO de rat ont été ensemencées sur des lamelles « coatés » à la polysine et ont été cultivées dans un milieu supplémenté en bFGF et pDGF qui favorise leur prolifération.

Lorsqu'une fixation paraformaldéhyde (PFA), suivie d'une perméabilisations au triton X100, est utilisée, nous confirmons en immunofluorescence à l'aide d'un anticorps anti S100B monoclonal (S16) une accumulation de la S100B dans le noyau. Mais l'immunomarquage S100B n'est pas strictement restreint à ce compartiment. Afin d'analyser plus en détail la distribution de la fraction cytosolique, le marquage S100B a également été analysé suite à une fixation PFA, mais cette fois-ci sans perméabilisation triton X100. Dans ces conditions, on observe que la distribution de la fraction S100B cytosolique n'est pas homogène, mais que celle-ci s'accumule fortement dans des zones péri-nucléaires fortement enrichies en mitochondries (figure 28A).

Au vu de cette colocalisation partielle, pour analyser les capacités de la S100B à interagir avec les mitochondries, un extrait mitochondrial brut (« crude mitochondria ») de CPO a été préparé dans différentes conditions : avec ou sans calcium dans le tampon de préparation (figure 28B). Les fractions mitochondriales ont été obtenues par centrifugation différentielle : les cellules sont brisées de façon mécanique dans un tampon de lyse avec ou sans calcium, une première centrifugation à 1200g pendant 5 minutes permet d'obtenir la fraction nucléaire dans le culot, tandis qu'une seconde centrifugation à 11000g pendant 10 minutes permet de séparer les fractions mitochondries brutes et cytosol. Une analyse par Western Blot montre qu'une fraction de la S100B est enrichie de manière strictement dépendante du calcium avec la fraction brute de mitochondries. Au contraire dans les mitochondries préparées dans un tampon sans calcium (EDTA/EGTA) la S100B n'est pas détectée. Ce résultat suggère qu'une fraction de la S100B cytosolique est capable d'interagir avec les mitochondries d'une manière dépendante du calcium.

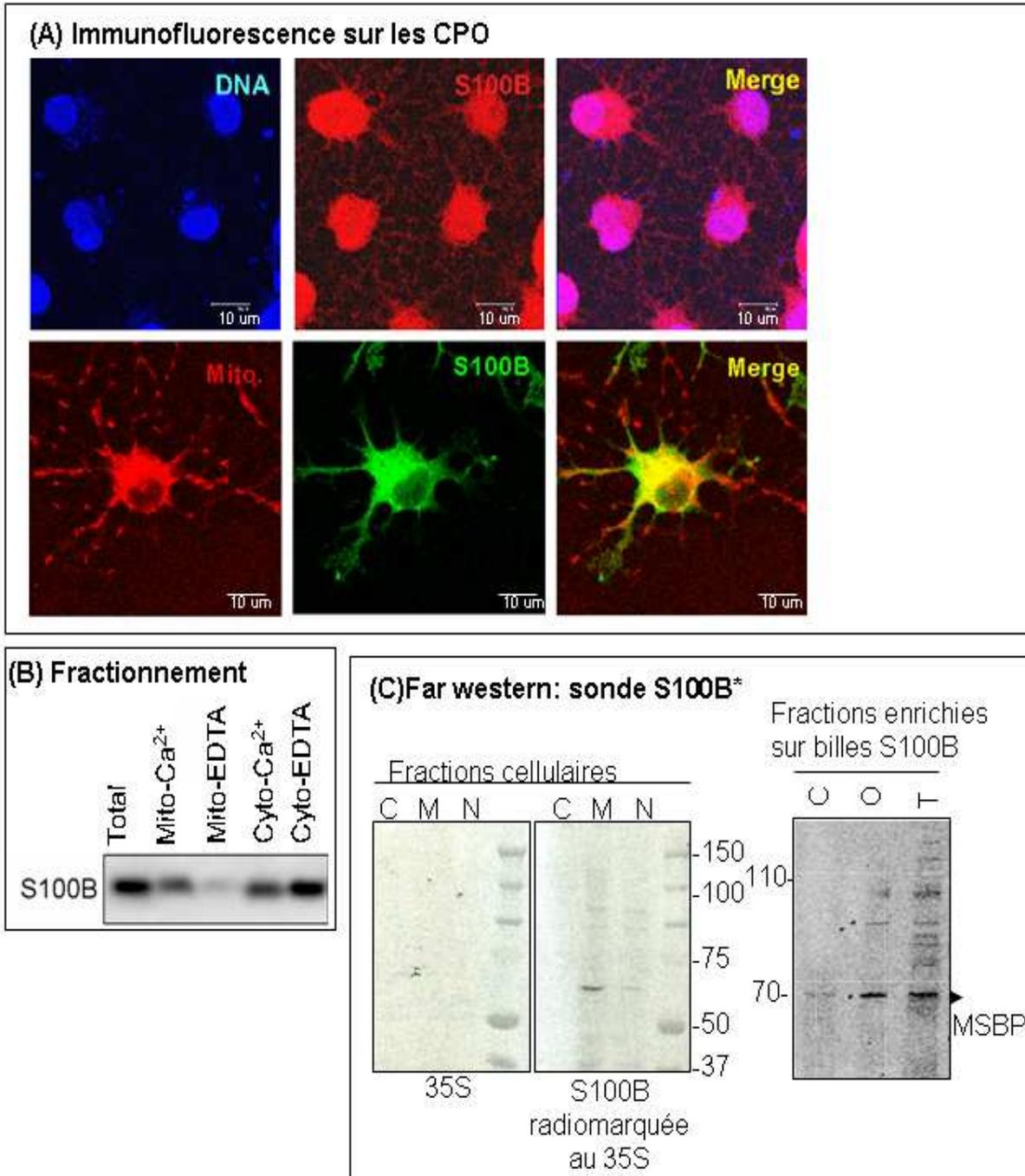


Figure 28 : Identification et clonage de MSBP comme une cible de la S100B dans une fraction cellulaire enrichie en mitochondries.

- (A) Une fraction cytosolique de S100B s'accumule autour des mitochondries dans les cellules CPO. Première ligne : les cellules ont été fixées au PFA, puis perméabilisées à 0,3 % Triton X100. Deuxième ligne : les cellules ont été incubées 45 min avec du mitotraker rouge (Mito) avant une fixation PFA sans perméabilisation Triton X100. Un anticorps monoclonal anti S100B (S16) est utilisé, et les cellules visualisées en immunofluorescence.
- (B) La S100B interagit de manière calcium dépendante avec la fraction mitochondriale dans les CPO. Une fraction brute de mitochondries et une fraction cytosolique sont préparées par centrifugation différentielle dans différentes conditions : avec et sans calcium (0,3mM). Le contenu en S100B de ces

fractions est analysé par Western Blot.

- (C) La S100B interagit directement avec une nouvelle protéine, MSBP, présente dans la fraction enrichie en mitochondries. Des fractions subcellulaires sont générées dans les CPO : mitochondriale (M), nucléaire (N), cytosolique (C). Puis la technique du Far Western est utilisée : les extraits sont séparés en gel SDS-PAGE, transférés sur membrane de nitrocellulose, et hybridés par une sonde S100B radiomarquée au ^{35}S . Une cible majeure, enrichie dans la fraction mitochondriale, est reconnue par la S100B. Cette cible est enrichie sur des billes S100B sépharose (panneau de droite). La bande correspondant à la cible majeure de la S100B est identifiée par spectrométrie de masse MS/MS et nommée MSBP. Organelles (O), extrait protéique total (T).

Dans le but de visualiser la cible protéique de la S100B à la mitochondrie, différentes fractions cellulaires ont été préparées à partir de CPO de même que précédemment : nucléaire, cytosolique et mitochondriale (figure 28C). Ces fractions ont été analysées par la technique du Far Western : après migration en gel SDS-PAGE, et transfert sur membrane de nitrocellulose, une protéine S100B recombinante, radiomarquée au ^{35}S , est utilisée comme sonde pour hybrider la membrane. La S100B s'hybride avec une cible majeure, d'un poids moléculaire de 70 kDa, fortement enrichie dans la fraction mitochondriale par rapport aux fractions nucléaires et cytosoliques. Afin d'identifier par spectrométrie de masse cette cible il était nécessaire de l'enrichir. Pour cela un extrait d'organites issu de CPO a été passé à travers une colonne de billes S100B-sépharose. Les protéines interagissant avec les billes S100B sépharose ont ensuite été migrées en gel acrylamide, et la bande correspondant à la protéine précédemment identifiée comme la cible de la S100B en Far Western a été séquencée par spectrométrie de masse MS/MS grâce à une collaboration avec l'équipe du Docteur Jérôme Garin. Cette approche nous a permis d'identifier une protéine comme cible mitochondriale de la S100B, nous l'avons nommée MSBP (Mitochondria S100B Binding Protein).

MSBP : nomenclature

La protéine MSBP n'a jamais été étudiée de façon spécifique et la dénomination du gène et de la protéine correspondante varie d'une banque de données à l'autre. Ainsi, lors d'analyses globales, du protéome, du transcriptome, différents noms de référence peuvent être utilisés, ce qui ne facilite pas l'analyse bibliographique. Le cDNA a été séquencé de nombreuses fois par des consortiums. L'un d'eux a nommé le gène et son produit protéique Tob3. Si ce nom a parfois été repris (Gires et al., 2004; Schaffrik et al., 2006), une telle dénomination paraît

injustifiée : MSBP ne partage aucune caractéristique avec les autres membres de la famille Tob. L'orthologue de *Drosophila* a été séquencé par hasard par un laboratoire, et fut dénommé Belphegor (Bor), nom qui a été conservé dans le génome de la drosophile. Le choix d'un tel nom semble uniquement être d'inspiration poétique. Lors du séquençage du génome humain, les deux gènes ont été nommés ATAD3A et ATAD3B, ce qui dans la nomenclature officielle signifie : « ATPase family, AAA domain containing 3A » et « ATPase family, AAA domain containing 3B » respectivement. Cependant si cette dénomination semble plus rigoureuse, elle n'a pour l'instant été reprise que dans une publication (Geuijen et al., 2005).

MSBP : phylogénie

MSBP appartient à la famille AAA

Lors d'une analyse phylogénique de la famille AAA (Frickey and Lupas, 2004), la protéine MSBP a été incluse comme membre de la famille au sens le plus strict : MSBP n'appartient pas seulement à la famille au sens large, famille AAA+, mais appartient également à cette famille (figure 29) sous sa forme la plus restreinte, la famille AAA. Lors d'un alignement avec les autres membres de la famille AAA, les domaines SRH, WalkerA, WalkerB, ainsi que les résidus clés impliqués dans la fixation et l'hydrolyse de l'ATP, le « sensor I », le « sensor II », et le doigt arginine, sont conservés (figure 29). Il est donc fort probable que la protéine MSBP soit présente sous la forme d'un hexamère en anneau et soit capable de fixer et d'hydrolyser l'ATP, comme tous les membres de la famille déjà décrits.

Une analyse de l'arbre phylogénique du domaine AAA montre que le groupe MSBP n'appartient à aucune des cinq branches principales, mais est directement branché à la racine de l'arbre (Frickey et Lupas, 2004). Cet isolement ne permet donc pas d'émettre des hypothèses quant à la fonction de MSBP, car les branches qui entourent MSBP ont des fonctions trop variées.

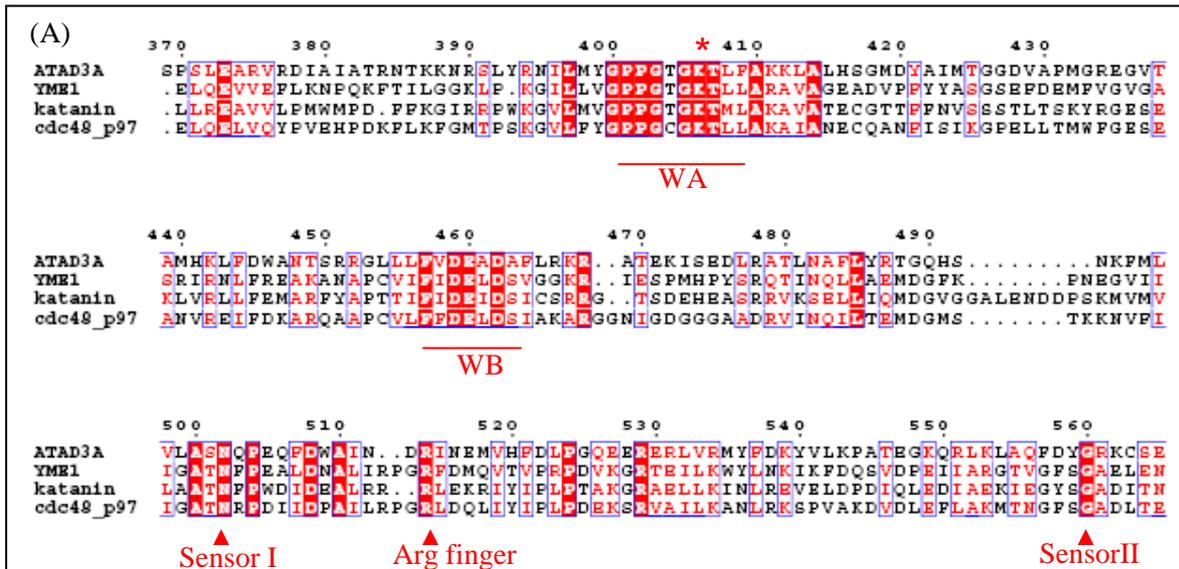


Figure 29 : MSBP : une protéine capable d’oligomériser, de fixer et d’hydrolyser l’ATP ?

(A) Alignement de la séquence de la protéine MSBP avec d’autres membres de la famille AAA. Les motifs clés impliqués dans la fixation de l’ATP sont représentés : sensor I, sensor II, doigt arginine (Arg), Walker A (WA) et Walker B (WB). Ils sont conservés dans la protéine MSBP (ici nommée ATAD3A).

En revanche une analyse phylogénétique sur une séquence plus petite, le domaine N-terminal, peut s’avérer plus informative et plus judicieuse (Frickey et Lupas, 2004). Ce domaine correspond au site de fixation des substrats, un domaine critique pour la fonction de MSBP. Lors de cette analyse les groupes les plus étroitement associés à MSBP sont en premier lieu : le groupe de la katanine, puis le groupe YTA7 et le groupe de la spastine, et enfin plus distant, le groupe du protéasome. Il est intéressant à noter, que lors de l’analyse du site de fixation des substrats, les deux familles les plus proches de MSBP, Katanine et Spastine, sont impliquées dans des interactions avec les microtubules (Baas et al., 2005; Qiang et al., 2006; Roll-Mecak and Vale, 2005; Wood et al., 2006).

MSBP : gènes orthologues

L’analyse de MSBP dans les génomes ne permet d’identifier aucun orthologue, ni chez la levure, ni chez les procaryotes. D’un point de vue évolutif MSBP semble donc être apparue avec les eucaryotes supérieurs : des homologues sont clairement identifiables chez les plantes (*A. thaliana*), les nématodes (*C. elegans*), les insectes (*D. melanogaster*). La séquence de la protéine MSBP est ainsi très conservée : 39% d’identité entre la protéine MSBP humaine et un orthologue présent chez les plantes, la protéine d’*A. thaliana* Q8RXIO (figure 30 et 31).

Cette forte conservation suggère que la protéine MSBP est impliquée dans des processus vitaux. En accord avec ce résultat, l'invalidation de l'orthologue de MSBP chez le nématode *C. elegans* est létale au cours du développement dès les premières divisions cellulaires (Kamath and Ahringer, 2003; Kamath et al., 2003; Piano et al., 2002; Simmer et al., 2003; Sonnichsen et al., 2005). Une collaboration récente au laboratoire avec le Docteur Emmanuel Taillbourg a permis de montrer que chez la drosophile, l'invalidation homozygote empêche les drosophiles de dépasser les stades L1 du développement. Si le développement est plus avancé que chez la drosophile, c'est probablement grâce aux ARNm maternels encore présents dans l'œuf.

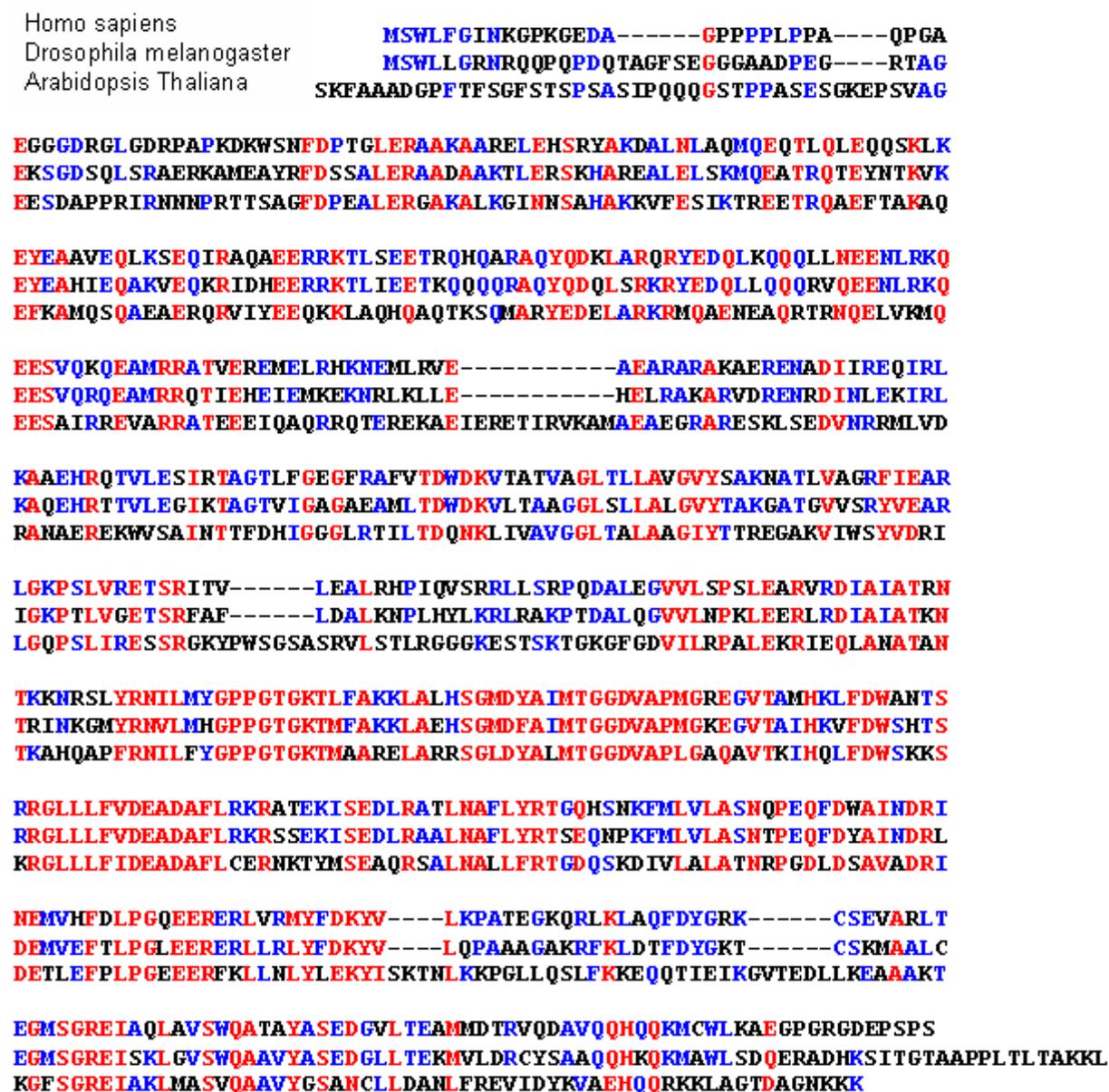


Figure 30 : MSBP une séquence fortement conservée chez les eucaryotes supérieurs.

Alignement entre les orthologues de la protéine MSBP. La protéine MSBP1 humaine et un orthologue présent

chez les plantes, la protéine d'A. Thaliana Q8RXIO, conservent 39% d'identité. Chez la levure aucun paralogue n'est identifié.

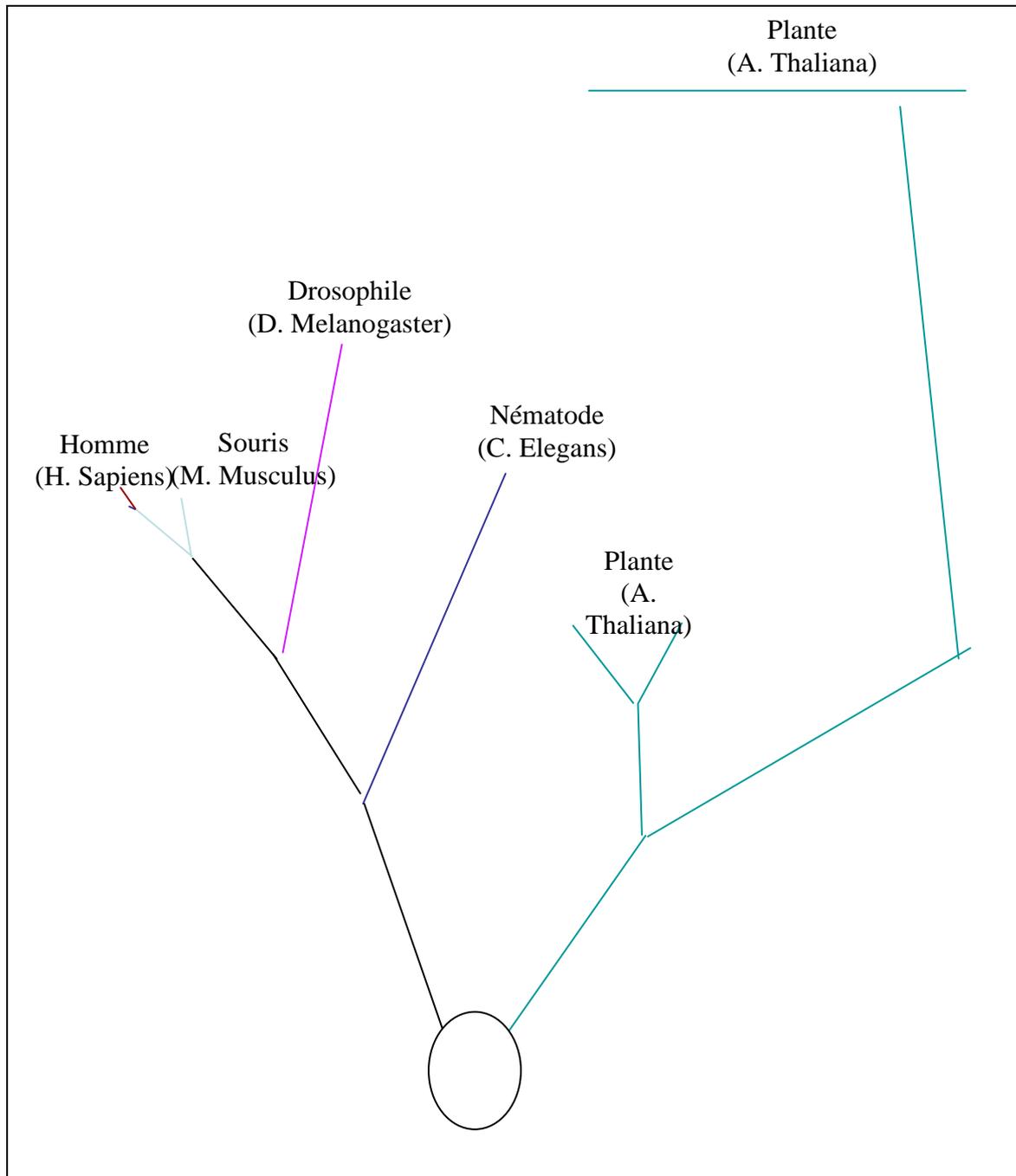


Figure 31 : Représentation sur un arbre phylogénique des duplications des gènes MSBP au cours de l'évolution.

Le cercle représente la racine de l'arbre. Cet arbre a été construit avec le logiciel « phylip ». Le gène MSBP s'est dupliqué une fois chez l'homme, trois fois chez les plantes.

Une seule copie du gène est présente dans les génomes des nématodes (*C. elegans*), des insectes (*D. melanogaster*), des rongeurs (*M. musculus*, *Ratus norvegicus*). En revanche, le gène MSBP s'est dupliqué deux fois de façon indépendante au cours de l'évolution : une simple duplication chez l'homme et des duplications multiples chez les plantes (figure 31). Chez les plantes, jusqu'à 4 gènes MSBP paralogues sont identifiables dans le génome.

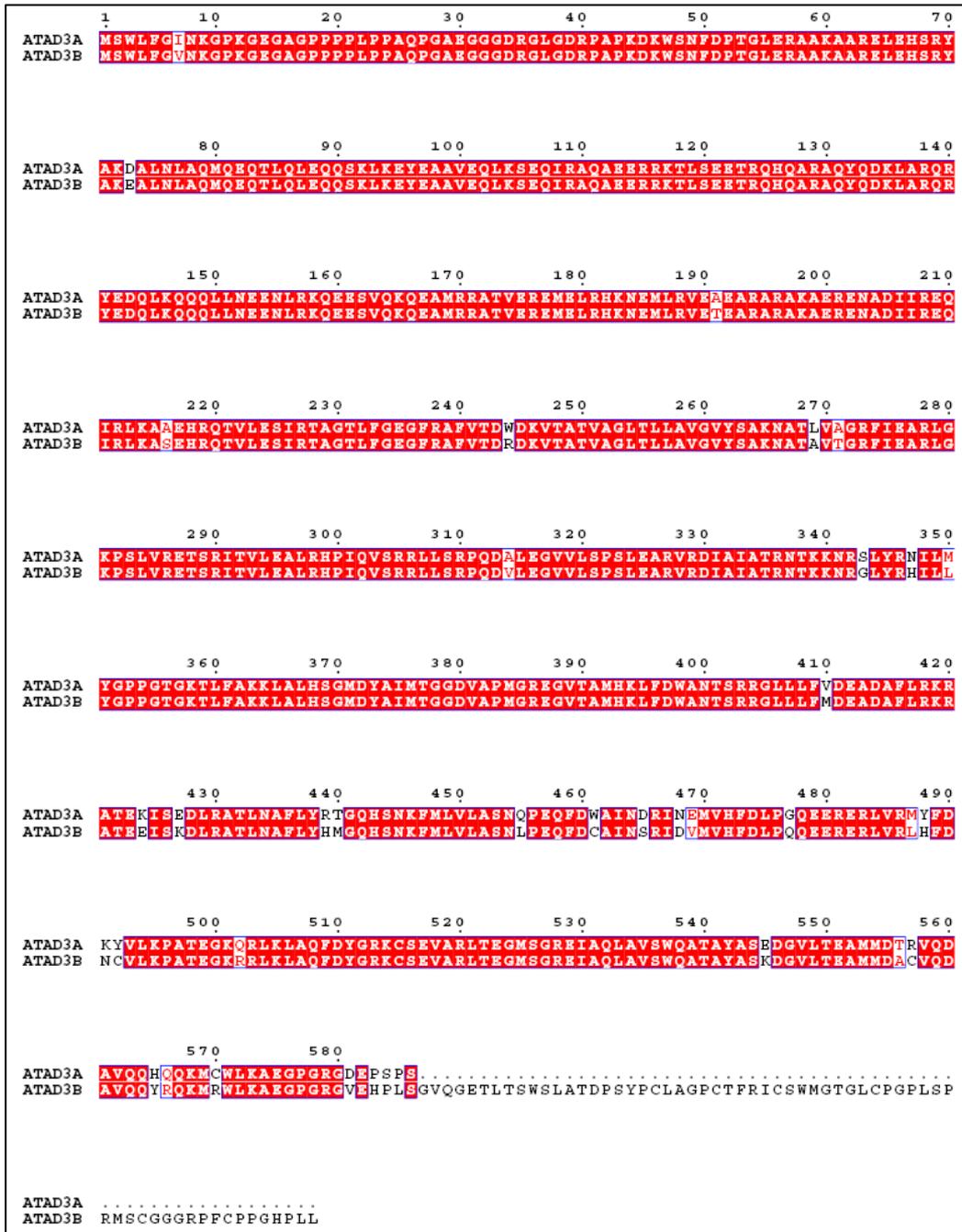


Figure 33 : Alignement des protéines humaines MSBP1 (ATAD3A) et MSBP2 (ATAD3B).

Les deux protéines partagent 93% d'identité sur la séquence qui leur est commune et MSBP2 comporte 62 acides aminés supplémentaires côté C-terminal : la disparition d'un codon stop permet la traduction d'une séquence non traduite chez MSBP1.

Chez l'homme, un paralogue est présent, les deux gènes sont en tandem, à l'extrémité distale du chromosome 1 au locus 1p36.33 (figure 32). Cette duplication semble très récente, chez le chimpanzé une seule copie du gène semble présente. Cette dernière information doit être prise avec précaution, la séquence du génome du chimpanzé n'étant pas encore définitive, en revanche la présence d'un gène unique chez les rongeurs peut-être considérée comme certaine.

En accord avec une duplication très récente, entre le chimpanzé et l'homme, la conservation de séquence est très forte entre les deux paralogues humains. La structure des gènes est similaire : le nombre d'exons est identique et seule la longueur des introns varie (figure 32). L'identité stricte de séquence est de 93% (figure 33). La divergence la plus forte est localisée dans la zone C terminale, le remplacement d'un codons Stop a permis à une séquence 3'UTR non traduite chez MSBP1 d'être traduite chez MSBP2, ce qui rajoute 62 acides aminés coté C-terminal dans MSBP2 par rapport à MSBP1.

Validation des outils

Afin de poursuivre la caractérisation de ces protéines MSBP des anticorps ont été générés chez le lapin : un anticorps dirigé contre l'épitope N-terminal, commun aux protéines MSBP1 et MSBP2 humaines, et un anticorps dirigé contre l'épitope C-terminal, spécifique à MSBP1 (figure 34A). Les ADNc humains correspondant à MSBP1 et MSBP2 ont également été sous-clonés à l'aide de ADNc fournis par le consortium I.M.A.G.E. Ainsi à l'aide des anticorps, par une analyse en Western Blot, les protéines recombinantes MSBP1 et MSBP2 produites en lysat de réticulocyte ont pu être comparées aux protéines endogènes d'extraits cellulaires totaux de la lignée cellulaire U87 (figure 34B). Le poids moléculaire apparent des protéines endogènes et recombinantes est identique, 70 kDa pour MSBP2 et 67 kDa pour MSBP1. La transfection des ADNc de MSBP1 et de MSBP2 dans des cellules et l'analyse de leur expression dans des extraits cellulaires totaux par Western blot après 48h de transfection, confirme la spécificité des anticorps utilisés : ne sont détectées par les anticorps que les protéines MSBP endogènes ou transfectées (figure 34C).

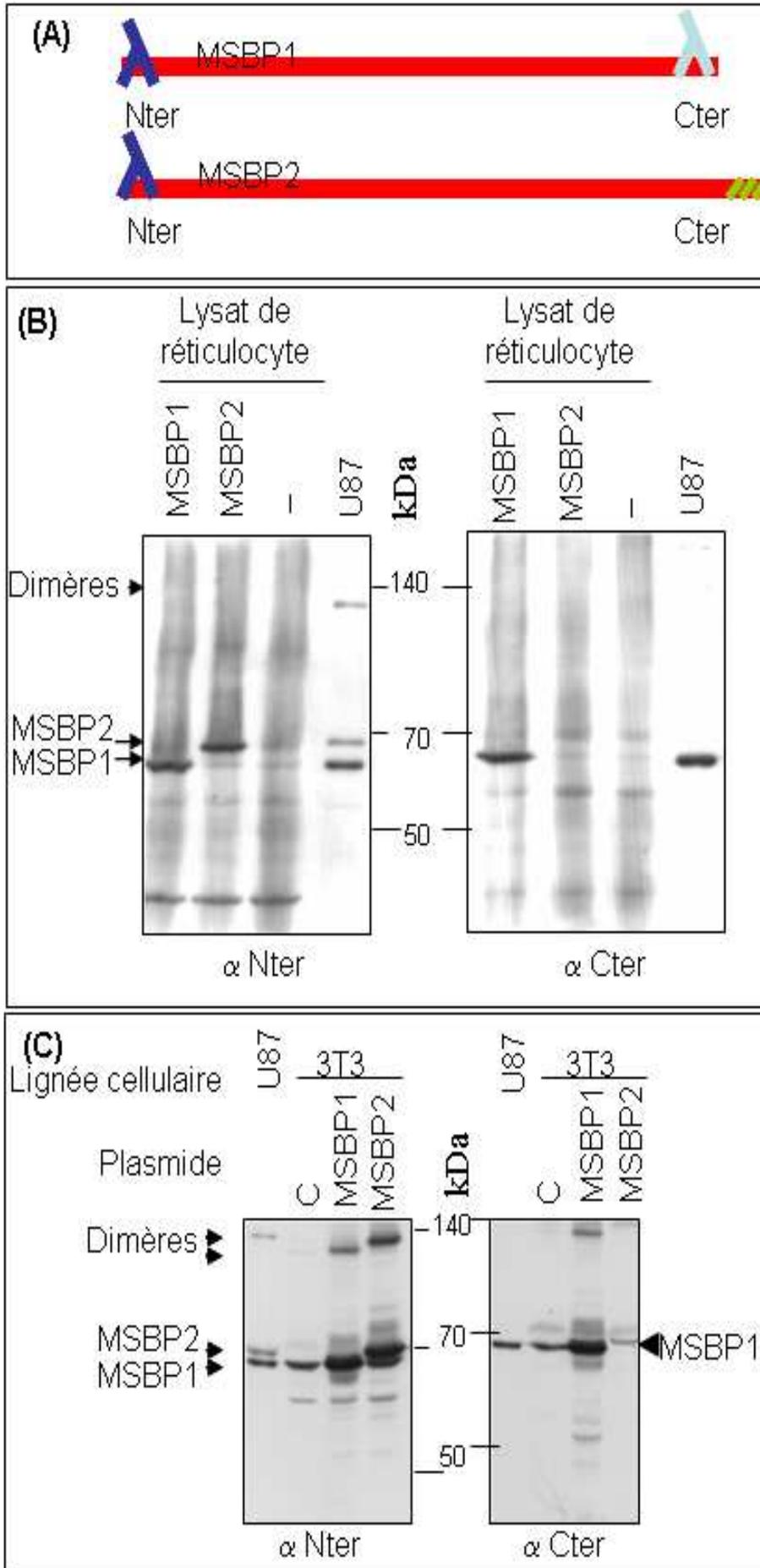


Figure 34 : validation des anticorps

(A) Représentation schématique des protéines MSBP1 et MSBP2 et des épitopes contre lesquels les anticorps sont dirigés. L'anticorps N-terminal reconnaît les protéines MSBP1 et MSBP2 humaines, ainsi que la protéine MSBP de souris et de rat. L'anticorps C-terminal reconnaît uniquement la protéine MSBP1 humaine.

(B) Caractérisation des ADNc et des anticorps. Transcription et traduction in vitro en lysat de réticulocyte des ADNc de MSBP1 et MSBP2, ou d'un vecteur vide (-), et analyse en Western blot avec en comparaison des extraits cellulaires totaux de la lignée U87.

(C) Transfection dans des cellules 3T3 des ADNc de MSBP1 et MSBP2, ou d'un vecteur vide (-), et analyse en Western Blot après 48h. La lignée U87 est utilisée comme un contrôle positif exprimant les deux protéines endogènes.

S100B/MSBP : une interaction spécifique et régulée par le calcium

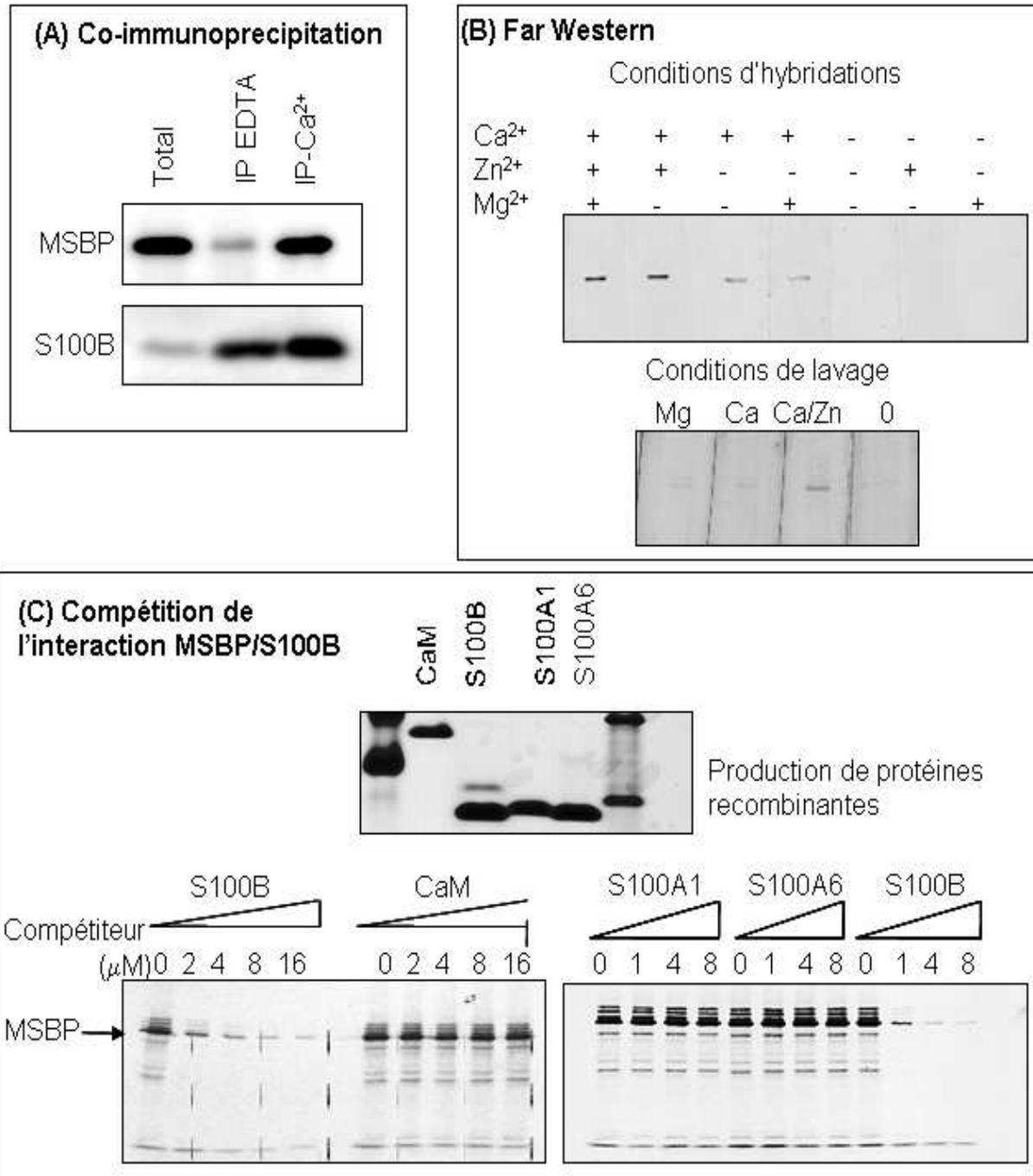


Figure 35 : L'interaction MSBP/S100B est spécifique et dépendante du calcium.

(A) MSBP co-immunoprécipite avec la S100B de manière dépendante du calcium. Un lysat cellulaire de CPO est incubé en présence d'un anticorps anti S100B en présence ou en absence de calcium (EDTA). Les protéines MSBP immunoprécipitées avec la S100B sont analysées en Western Blot.

(B) L'interaction S100B/MSBP, dépendante du calcium, est potentialisée par le zinc. L'influence des conditions ioniques sur l'interaction S100B/MSBP est analysée par Far western : des extraits protéiques sont séparés en gel SDS-PAGE, transférés sur membrane de nitrocellulose, et hybridés par une sonde

S100B radiomarquée au ^{35}S dans différentes conditions ioniques (10 μM ZnSO_4 , 2mM MgCl_2 , 0,3mM CaCl_2 , 2mM EDTA, 2mM EGTA).

- (C) D'autres protéines S100 sont incapables de compéter l'interaction MSBP/S100B. Panneau du haut : la purification des protéines recombinantes est analysée par un gel SDS-PAGE coloré au bleu de coomassie. Panneau du bas : La protéine MSBP radiomarquée produite en lysat de réticulocyte est incubée avec des billes de S100B sépharose. Des concentrations croissantes de protéines recombinantes comme compétiteurs potentiels sont ajoutées. La protéine MSBP radiomarquée qui reste fixée aux billes S100B sépharose est révélée par autoradiographie.

Nous avons précédemment montré l'interaction entre la S100B et MSBP par Far Western en utilisant la protéine S100B radiomarquée comme sonde. Pour confirmer l'interaction des protéines MSBP et S100B endogènes, nous avons démontré dans les CPO de rat que les deux protéines peuvent être immunoprécipitées par un anticorps dirigé contre la S100B, et cela d'une manière dépendante du calcium (figure 35A). Lorsque le calcium est retiré du tampon d'interaction (EDTA/EGTA), la coimmunoprécipitation disparaît. Les protéines MSBP et S100B endogènes peuvent donc interagir, et ce de manière strictement dépendante du calcium.

La S100B est une calciprotéine dont la conformation et l'interaction avec des protéines cibles peuvent être régulées par le calcium, mais également par d'autres ions comme le zinc. L'interaction des protéines S100B recombinantes radiomarquées au ^{35}S en lysat de réticulocyte avec les protéines MSBP en Far Western a donc été testée dans différentes conditions ioniques plus en détails (figure 35B). Le calcium seul est suffisant pour promouvoir une telle interaction. En revanche, si le zinc seul ne permet pas cette interaction, le zinc additionné au calcium renforce cette interaction comparée à la condition calcium seul. Cette interaction est réversible, si les ions sont retirés dans le tampon de lavage, l'interaction disparaît. L'interaction entre la protéine MSBP1 et S100B est donc réversible, dépendante du calcium et potentialisée par le zinc.

Par ailleurs nous avons testé la spécificité de cette interaction. En effet la S100B appartient à la large famille des S100 qui comporte 20 membres, et certaines S100, comme la S100A1, partagent certaines de leurs cibles avec la S100B. Pour tester la spécificité de cette interaction entre MSBP et S100B, d'autres protéines S100 ont été utilisées comme compétiteurs pour dissocier l'interaction entre les protéines MSBP et S100B (figure 35C). Les protéines recombinantes S100B, S100A6, et S100A1 sont produites en bactérie et purifiées. Leur pureté est vérifiée par une migration en SDS-PAGE et une coloration au bleu de Coomassie. Ces protéines sont ensuite utilisées à des concentrations croissantes comme compétiteurs lorsque

des protéines MSBP recombinantes radiomarquées au ^{35}S en lysat de réticulocyte interagissent avec des protéines S100B-sépharose. Seule la S100B recombinante s'avère capable de compéter sa propre interaction avec MSBP. Ni la S100A6, ni la S100A1 ne s'avèrent capables de dissocier l'interaction entre la protéine MSBP et les billes S100B-sépharose. L'interaction entre la S100B et MSBP est donc fortement spécifique.

La capacité des protéines S100B et MSBP endogènes à interagir en co-immunoprécipitation, la forte spécificité de l'interaction de la protéine MSBP avec la S100B par rapport aux autres membres de la famille S100, la régulation de cette interaction par le calcium, tous ces résultats supportent l'idée que ces protéines interagissent *in vivo*.

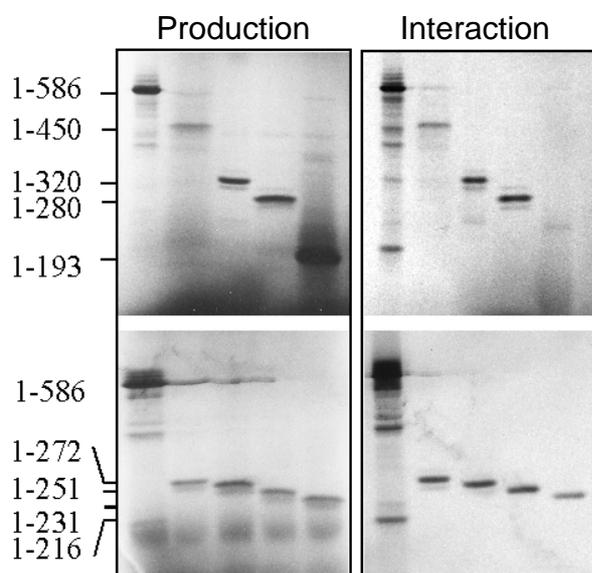


Figure 36 : le domaine 193-216 de MSBP contient des résidus critiques pour son interaction avec la S100B.

Panneau de gauche : production de protéines MSBP tronquées radiomarquées en lysat de réticulocyte. Les protéines sont révélées par autoradiographie sur la nuit après migration en SDS-PAGE. Panneau de droite : sont révélées les protéines qui restent fixées sur les billes S100B sépharose. Les numéros des constructions correspondent aux positions des acides aminés : 1-586, construction sauvage, 1-450, seuls les acides aminés 1 à 450 sont conservés.

Pour cartographier le site de fixation de la S100B sur la protéine MSBP, différentes protéines MSBP radiomarquées et tronquées côté C-terminal ont été générées en lysat de réticulocyte, et leur capacité à interagir avec les billes S100B-sépharose testée (figure 36). Alors que la protéine 1-216 (délétée des acides aminés 217-586) interagit avec les billes S100B-sépharose, la protéine 1-193 (délétée des acides aminés 194-586) n'interagit plus. Cette expérience montre que le domaine 193-216 comporte des acides aminés essentiels pour l'interaction de MSBP avec la S100B.

La S100B inhibe l'oligomérisation de MSBP

Les protéines membres de la famille AAA forment des oligomères (Frickey and Lupas, 2004; Lupas and Martin, 2002). Lorsque des extraits cellulaires totaux sont analysés par Western

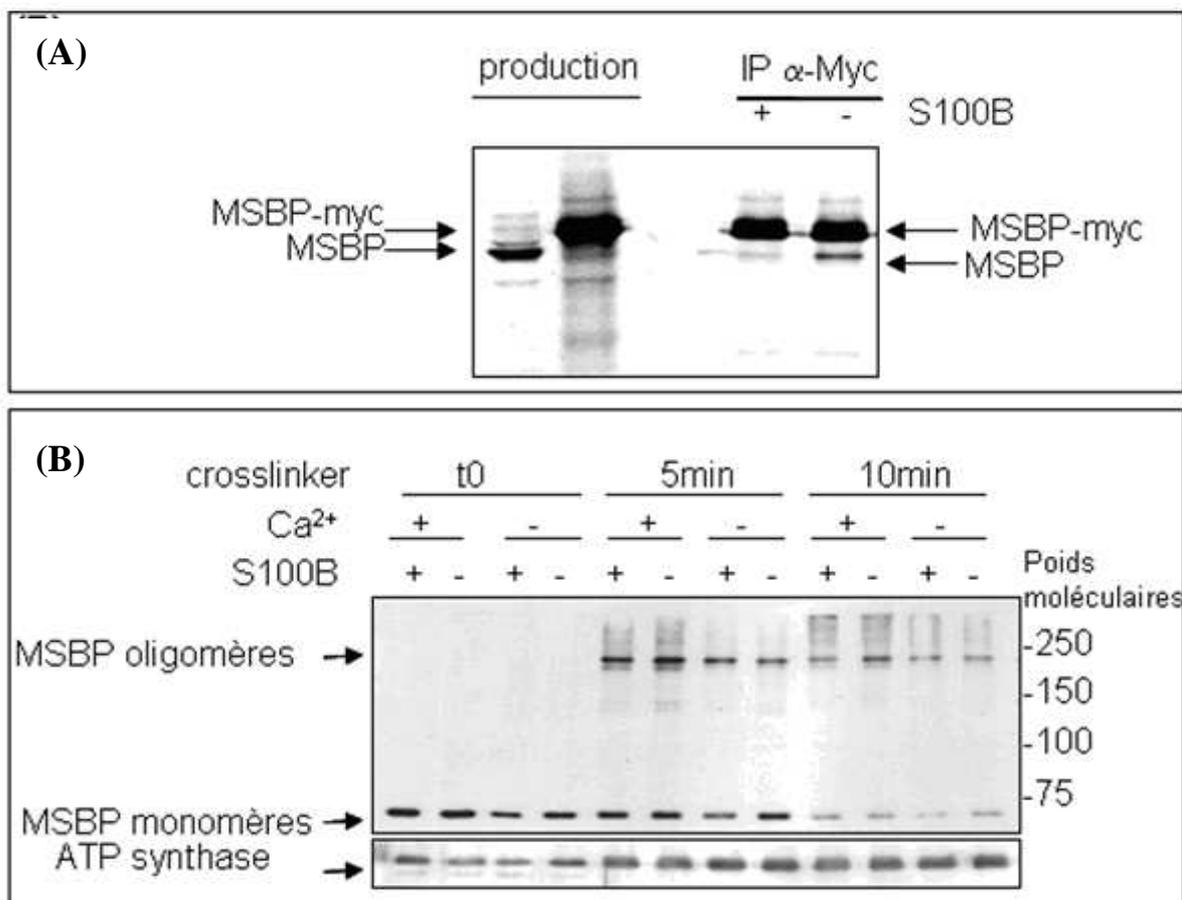


Figure 37 : la S100B inhibe l'oligomérisation de MSBP.

(A) La S100B inhibe la co-immunoprécipitation de MSBP1 avec MSBP1-myc. Les protéines MSBP1 et MSBP1-myc radiomarquées au ³⁵S sont produites en lysat de réticulocyte et mélangées. Une immunoprécipitation anti myc est effectuée en présence ou en absence de S100B, et les protéines MSBP révélées par autoradiographie après une migration en SDS-PAGE.

(B) La S100B inhibe de manière calcium dépendante l'oligomérisation de la protéine MSBP1 endogène. Un extrait de mitochondries brutes est préparé. Puis, en présence de 0,3 mM de calcium ou d'EDTA/EGTA, de la S100B est ou n'est pas ajoutée. Enfin le crosslinker BS3 est ajouté à 37°C et une analyse cinétique des échantillons est effectuée par Western Blot. La protéine F1 ATP synthase, présente sous forme d'hexamère côté matrice, est utilisée comme contrôle. La protéine MSBP est révélée avec l'anticorps anti C-ter.

blot, des dimères formés par les protéines MSBP endogènes sont observés (figure 37A). Ces dimères sont encore plus nettement visibles lorsque les ADNc de MSBP1 ou MSBP2 sont transfectés. Pour confirmer cette capacité à former des oligomères, des protéines MSBP1 recombinantes, avec et sans étiquette myc, ont été produites en lysat de réticulocytes et

mélangées (figure 37B). Lorsqu'une immunoprécipitation anti myc est effectuée, la protéine MSBP1 sans étiquette myc co-immunoprécipite, mais cette co-immunoprécipitation est inhibée par l'ajout de S100B recombinante. Pour valider la capacité de la S100B à inhiber la formation d'oligomères de MSBP endogènes mitochondriales, une expérience de crosslinking a été effectuée sur des mitochondries brutes en présence ou en absence de S100B et de calcium (figure 37C). Des mitochondries brutes sont préparées par centrifugation différentielle. Avant l'ajout du crosslinker BS3, seuls les monomères de MSBP1 sont observés en Western Blot. Après l'ajout du crosslinker, les oligomères sont visualisés en Western Blot, notamment des trimères. En présence de calcium, l'ajout de S100B diminue la quantité d'oligomères de MSBP1 détectée. En revanche dans des conditions EDTA/EGTA, chélateurs du calcium, la S100B est sans effet sur l'oligomérisation de MSBP1. L'ajout de S100B recombinante cytosolique inhibe donc la formation d'oligomères de la MSBP1 endogène, et ce d'une manière dépendante du calcium.

MSBP est une protéine mitochondriale transmembranaire intégrale, localisée aux sites de contacts entre les membranes internes et externes, l'extrémité N-terminale exposée côté cytosol, le domaine ATPase protégé dans la mitochondrie.

Précédemment, nous avons montré la localisation mitochondriale de MSBP par des approches biochimiques. Pour confirmer cette localisation, des ADNc avec une étiquette myc ont été construits. Une analyse par immunofluorescence dans les cellules 3T3 montre que la construction MSBP1-myc est localisée dans des structures ponctuées autour du noyau, un double marquage avec le mitotraker montre une colocalisation de MSBP-myc avec les mitochondries (figure 38A). Environ 50 % des protéines mitochondriales destinées à la mitochondrie portent typiquement un signal d'adressage sous la forme d'une préséquence reconnue par la translocase de la membrane externe (TOM), qui est clivée lors de la translocation. Le système d'adressage alternatif utilise des boîtes internes.

Les protéines MSBP1, de taille entière 1-586myc, ou 273-586myc sont adressées à la mitochondrie, en revanche la protéine 450-586myc présente un marquage cytosolique. Ces résultats confirment que la protéine MSBP1 est mitochondriale, en revanche il montre que l'adressage ne s'effectue pas via une préséquence N-terminale clivable, mais utilise le système d'adressage mitochondrial alternatif, les boîtes internes, qui sont ici comprises entre les acides aminés 273 et 450 dans le cas de MSBP.

Cette localisation mitochondriale des protéines MSBP1 exogènes ne résulte ni de leur surexpression ni de leur étiquette myc. En effet l'analyse de la localisation de la protéine

MSBP1 endogène à l'aide de l'anticorps C-terminal confirme cette localisation (figure 38B) : Le marquage MSBP et le marquage mitochondrial superposent parfaitement.

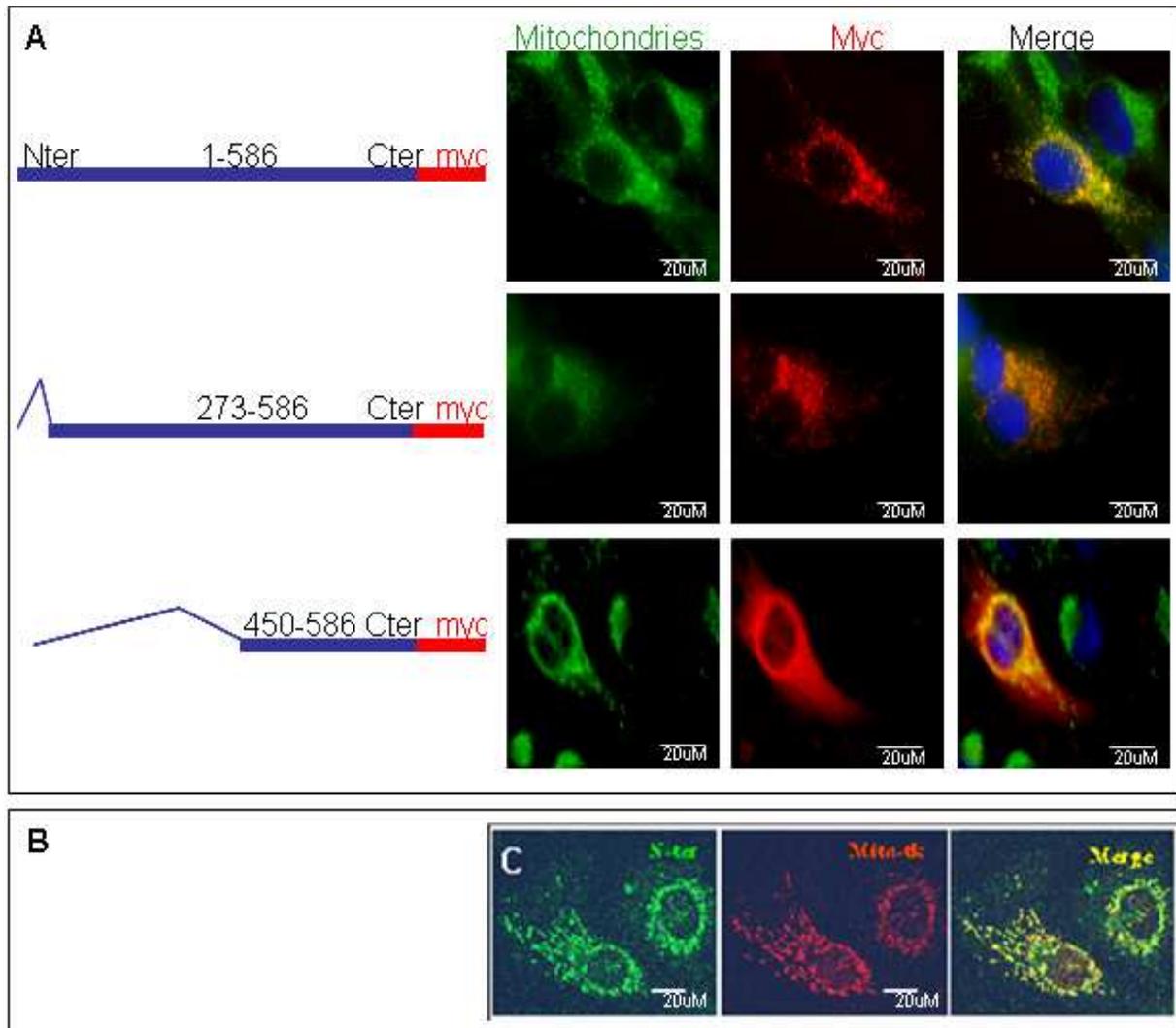


Figure 38 : Adressage de la protéine MSBP1 à la mitochondrie

(A) Le domaine N-terminal de MSBP1 n'est pas nécessaire pour son adressage à la mitochondrie. Analyse au microscope à fluorescence de protéines MSBP1 avec une étiquette myc. Les cellules 3T3 sont transfectées avec les constructions schématisées à gauche. Après 48 h d'expression les cellules sont incubées 45 min avec du mitotraker, puis fixées au méthanol. Les numéros des constructions correspondent aux acides aminés de la protéine sauvage.

(B) La protéine endogène localise également à la mitochondrie. Analyse au microscope confocal des protéines MSBP1 endogènes avec l'anticorps N-terminal après une incubation de 45 min avec du mitotraker, puis une fixation au méthanol.

La mitochondrie comporte différents compartiments : la membrane externe, la membrane interne, l'espace inter-membranaire, la matrice. Nous nous sommes donc intéressés à la localisation submitochondriale de la protéine MSBP. L'analyse bioinformatique de la

séquence de MSBP suggère l'existence de domaines transmembranaires, cependant leur nombre et leurs positions varient suivant les moteurs d'analyse utilisés.

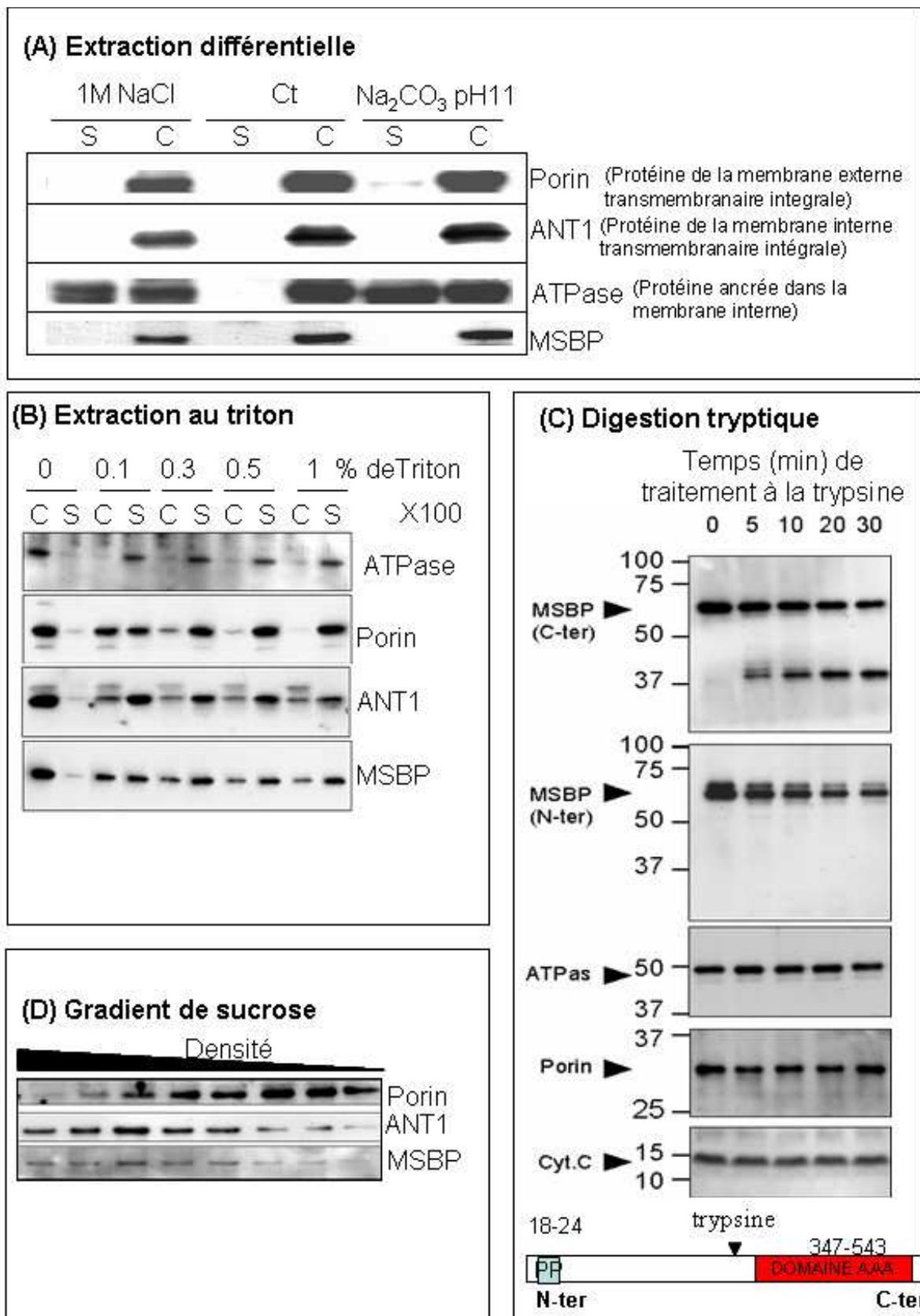


Figure 39 : MSBP une protéine transmembranaire intégrale, avec un domaine C-terminal, contenant la

boîte ATPase, protégé à l'intérieur de la mitochondrie, et un épitope N-terminal exposé côté cytosolique.

(A) MSBP est une protéine transmembranaire intégrale. Un extrait de mitochondries brutes est soumis à différentes extractions : au carbonate (Na_2CO_3 0.1M pH 11) ou au sel (1M NaCl). Après centrifugation les culots (C) et surnageants (S) sont analysés par Western blot. Marqueurs : Porine (Porin), une protéine transmembranaire intégrale de la membrane externe ; ANT1, une protéine transmembranaire intégrale de la membrane interne; la F1 ATP synthase (ATPase), une protéine de la matrice ancrée dans la membrane interne. Une extraction différentielle au Triton X100 (B) confirme ces résultats.

(C) La boîte ATPase C-terminal de MSBP est protégée à l'intérieur de la mitochondrie, son épitope N-terminal est exposé du côté du cytosol. Un extrait brut de mitochondries est incubé pendant des durées croissantes avec 2.5 μg de trypsine dans 100 μl d'un tampon PBS, et analysé par Western Blot. Les marqueurs utilisés sont les mêmes que ci-dessus auxquels est ajouté : le cytochrome C une protéine soluble de l'espace inter-membranaire.

(D) MSBP interagit avec la membrane interne. Des fractions submitochondriales sont générées et séparées sur un gradient de sucrose. Les différentes fractions sont analysées par Western Blot. Les marqueurs utilisés sont les mêmes que ci-dessus.

L'association de MSBP avec les membranes mitochondriales a été investiguée : des mitochondries brutes sont préparées, soumises à différents types d'extraction : à fortes concentrations de sel (NaCl, 1M), ou à pH basique (Na_2CO_3 , pH 11,5) (figure 39A). Les culots, fractions membranaires, et les surnageants, fractions solubles, sont analysés par Western Blot. Une protéine de la matrice faiblement ancrée dans la membrane interne (ATPase) est libérée de la fraction membranaire dans le surnageant, en revanche la protéine MSBP reste associée au culot, de même qu'ANT1 et la Porine, deux protéines transmembranaires intégrales. Lors d'une extraction à des concentrations croissantes de Triton X100, le profil d'extraction de la protéine MSBP est également similaire à celui des protéines ANT1 et Porine (figure 39B). Ces deux approches montrent que le profil d'extraction de MSBP est identique à celui des protéines transmembranaires mais différent de celui des protéines seulement ancrées dans ces membranes comme ANT1.

De même que la porine et ANT1, la protéine MSBP possède donc des segments transmembranaires et traverse soit la membrane externe, soit la membrane interne. Pour discriminer l'une ou l'autre de ces hypothèses, les mitochondries brutes sont soumises à une cinétique de digestion tryptique (figure 39C). Les protéines qui possèdent un segment cytosolique doivent être clivées par la trypsine. Le cytochrome C, localisé dans l'espace inter-membranaire, et qui n'est pas clivé, permet de vérifier que la membrane mitochondriale externe est intègre et ne laisse pas passer la trypsine. Les protéines MSBP de taille entière sont clivées et disparaissent au cours de la cinétique de digestion. Si l'épitope N-terminal de

MSBP disparaît complètement, en revanche l'épitope C-terminal de MSBP révèle qu'un petit peptide de 35 kDa est protégé de la digestion tryptique. D'après la séquence de la protéine, ce domaine de 35 kDa côté C-terminal de la protéine comporte la boîte ATPase de MSBP.

La protéine MSBP1 est donc une protéine de la membrane externe : l'épitope N-terminal est exposé côté cytosolique, tandis que le domaine C-terminal, porteur de la boîte ATPase, est protégé à l'intérieur de la mitochondrie.

La membrane mitochondriale externe n'est pas homogène. Certains domaines de cette membrane sont associés à la membrane interne. Différentes fractions mitochondriales ont été générées par un choc hypotonique suivi d'une sonication, et séparées sur un gradient discontinu de sucrose (figure 39D). Le marquage de la protéine MSBP se superpose à celui d'un marqueur de la membrane interne ANT1, et diverge de celui d'une protéine de la membrane externe, la porine. La protéine MSBP interagit donc avec la membrane interne. Associée aux résultats précédents, cette expérience montre que la protéine MSBP, une protéine transmembranaire intégrale, ancrée dans la membrane externe, est localisée aux sites de contacts avec la membrane interne.

L'invalidation partielle de l'expression de la protéine MSBP par une approche siRNA induit un retard dans la différenciation des CPO.

L'invalidation de la S100B induit un ralentissement de la différenciation des CPO (Deloulme et al., 2000). La protéine MSBP a été identifiée comme une cible mitochondriale de la S100B dans les CPO, nous nous sommes donc intéressés à l'influence de l'invalidation de cette cible chez les CPO. Pour cela une approche d'invalidation par siRNA a été choisie. L'efficacité du siRNA pour invalider l'expression de MSBP chez les CPO a été validée par Western Blot (figure 40A). Quatre jours après transfection, les extraits totaux de cellules transfectées par un siRNA sans cible spécifique ou par un siRNA spécifiquement dirigé contre MSBP sont analysés. Le siRNA spécifiquement dirigé contre MSBP est sans effet sur une protéine contrôle, la β -tubuline, mais induit, comme attendu, une nette diminution de l'expression de la protéine MSBP. Cette invalidation de l'expression de MSBP est confirmée par une immunofluorescence (figure 40B) qui permet de montrer que 30 à 40 % des CPO sont invalidées. Cependant dans les cellules invalidées, l'invalidation de l'expression de la protéine n'est pas totale, et une expression résiduelle est observée. La diminution de l'expression de MSBP est sans effet significatif sur la viabilité et la prolifération des CPO maintenues dans un

milieu de prolifération supplémenté en bFGF et PDGF. Le marquage de l'ADN ne révèle aucun signe d'apoptose. Les CPO ont ensuite été induites à se différencier. Lorsque l'expression de MSBP est invalidée par siRNA (figure 40 D), l'utilisation du marqueur de différenciation O4 en immunofluorescence montre un retard de différenciation dans les cellules invalidées : le marquage O4 est plus faible, et les cellules sont moins différenciées morphologiquement, elle présentent moins de « process chevelus ». Ce retard de différenciation n'est pas observé quand les cellules sont transfectées par un siRNA dirigé contre aucune cible (figure 40 C). L'invalidation de la S100B, ou de sa cible mitochondriale, MSBP, a donc un effet similaire chez les CPO : un ralentissement de la différenciation.

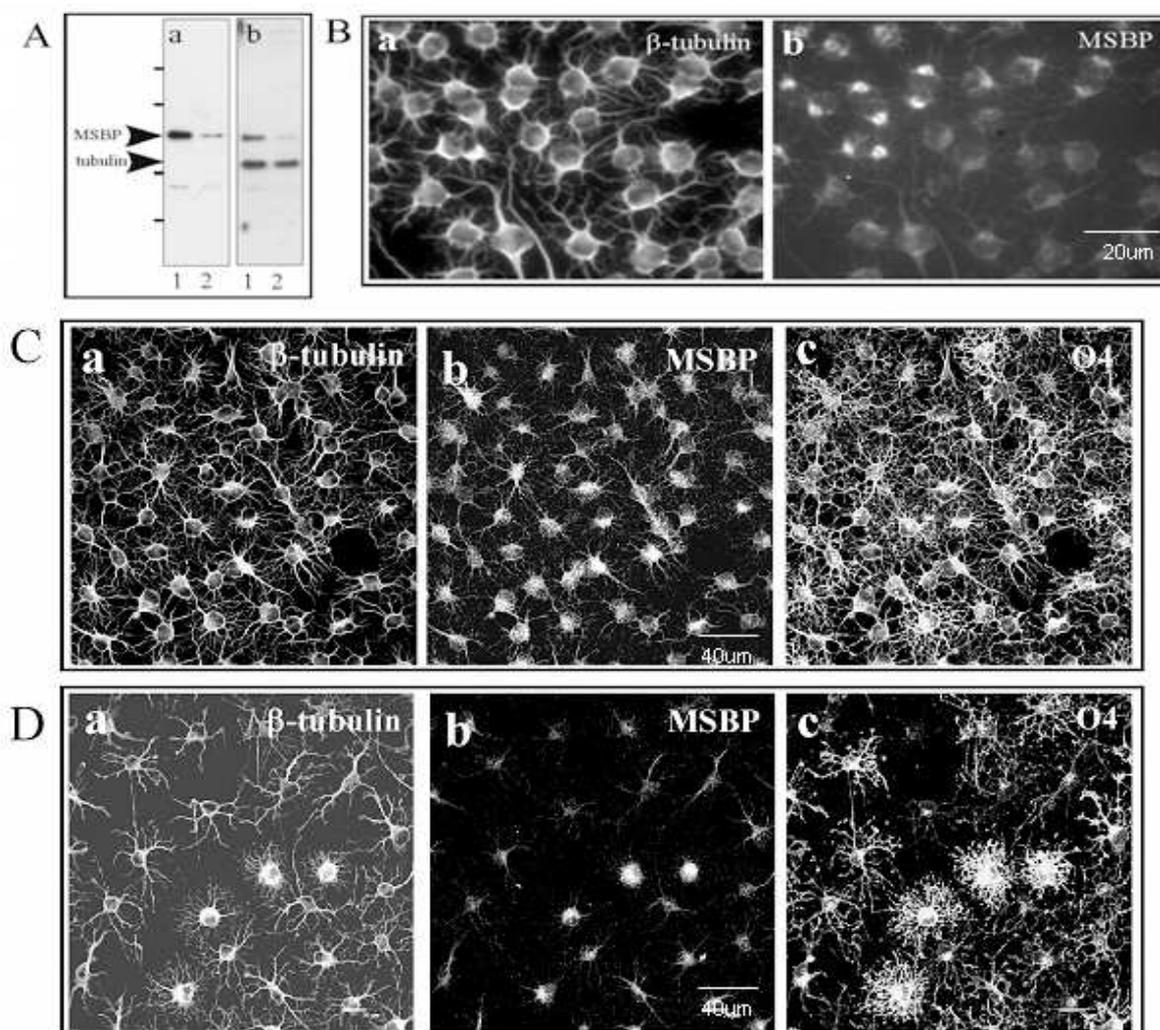


Figure 40 : L'invalidation de MSBP médiée par siRNA induit un retard de différenciation dans les CPO.

- (A) Analyse de l'efficacité du siRNA dirigé contre MSBP par Western blot. Les CPO sont transfectées avec un siRNA contrôle sans cible (piste 1), ou un siRNA dirigé contre l'expression de MSBP (piste 2), puis après 4 jours de transfection les extraits protéiques totaux sont analysés par Western Blot.
- (B) Les CPO sont transfectées avec un siRNA dirigé contre l'expression de MSBP, puis après 4 jours les cellules sont fixées au méthanol et analysées en immunofluorescence. L'anticorps N-ter permet de détecter l'expression de la

protéine MSBP, et un anticorps dirigé contre la tubuline permet de visualiser le cytosquelette.

- (C) et (D) Les CPO sont transfectées avec un siRNA contrôle sans cible (C), ou un siRNA dirigé contre l'expression des protéines MSBP (D). Après 4 jours les cellules sont induites à se différencier. Après 3 jours de différenciation, les cellules sont fixées au PFA et visualisées par immunofluorescence. L'anticorps N-ter permet de visualiser les cellules invalidées, tandis que le marqueur O4 permet d'analyser la différenciation.

L'invalidation de l'expression de la protéine MSBP inhibe l'accumulation périnucléaire des mitochondries

Il a été proposé que la S100B régule de manière dépendante de l'ATP et du calcium les sites d'interactions entre le RE et les mitochondries (Vance and Steenbergen, 2005). Nous avons donc voulu savoir si l'ATPase MSBP, identifiée comme une cible de la S100B dépendante du calcium, localisée à la mitochondrie, pourrait réguler la distribution mitochondriale. Pour cela, l'expression de la protéine MSBP a été invalidée par l'utilisation de siRNA dans un modèle de cellules gliales, lignée U373, plus simple que les CPO, et qui surtout permet d'augmenter l'efficacité d'invalidation par siRNA. L'efficacité des siRNA est validée à 3 et 6 jours post transfection en Western Blot : si un siRNA contrôle sans cible spécifique est sans effet, un mélange de siRNA spécifiquement dirigé contre MSBP induit une nette diminution de l'expression de la protéine MSBP, contrairement à celle de protéines contrôles que sont la β -tubuline et la β -caténine. Après cela l'influence de l'invalidation de MSBP sur la distribution des mitochondries a été analysée par immunofluorescence (figure 41).

En immunofluorescence, l'utilisation d'un anticorps N-terminal, dirigé contre la protéine MSBP endogène, permet de visualiser les cellules invalidées pour MSBP. La distribution des mitochondries est visualisée et confirmée par deux types de marqueurs : la mitotraker ou la F1 synthase. Dans les cellules U373 contrôles, qui sont transfectées par un siRNA sans cible spécifique, ou qui ne sont pas transfectées, les mitochondries ne sont pas distribuées avec une symétrie radiaire autour du noyau, mais s'agrègent dans la grande majorité des cellules à un pôle du noyau, comme le montre l'accumulation des mitochondries autour du marqueur GM130. Nous avons décidé de nommer ce lieu où s'agrègent les mitochondries, centre périnucléaire d'organisation des mitochondries. Au contraire des cellules contrôles, cette polarisation disparaît dans les cellules invalidées pour MSBP : les mitochondries se dispersent dans la cellule et se distribuent tout autour du noyau avec une symétrie radiaire.

La première des fonctions cellulaires de la mitochondrie est la respiration. Nous avons donc cherché à savoir si l'invalidation de l'expression de la protéine mitochondriale MSBP par

siRNA pouvait perturber l'activité respiratoire. Le réactif Wst1, qui peut être appliqué sur des cellules vivantes, permet de mesurer l'activité de la succinate-tétrazolium réductase (Hopper, 1997), une enzyme de la chaîne respiratoire mitochondriale. Par une mesure de l'absorbance de Wst1, la densité de l'activité respiratoire mitochondriale peut être comparée à la densité cellulaire elle-même mesurée à l'aide du cristal Violet. Ces mesures sont effectuées après cinq jours de transfection d'un siRNA sans cible spécifique ou d'un siRNA spécifiquement dirigé contre MSBP. Aucune différence n'est détectée entre ces deux conditions. L'invalidation de la protéine MSBP ne s'accompagne pas d'une perturbation de l'activité respiratoire mitochondriale, la redistribution des mitochondries ne résulte pas d'une perturbation du métabolisme mitochondrial (figure 41D). La protéine MSBP est donc directement impliquée dans l'ancrage des mitochondries autour du centre organisateur péri-nucléaire.

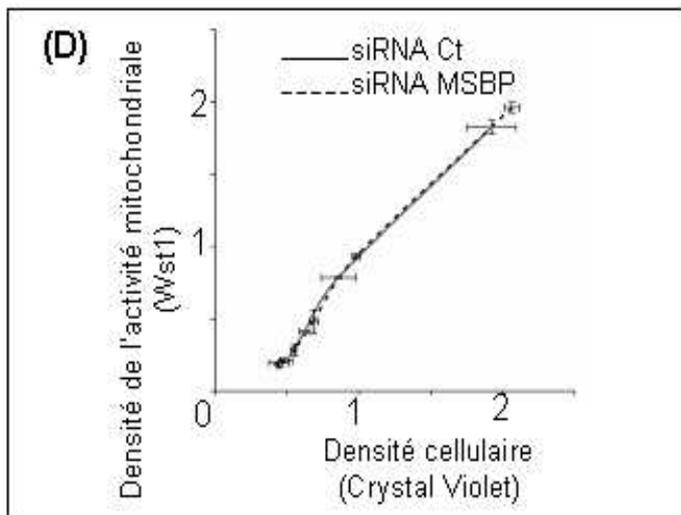
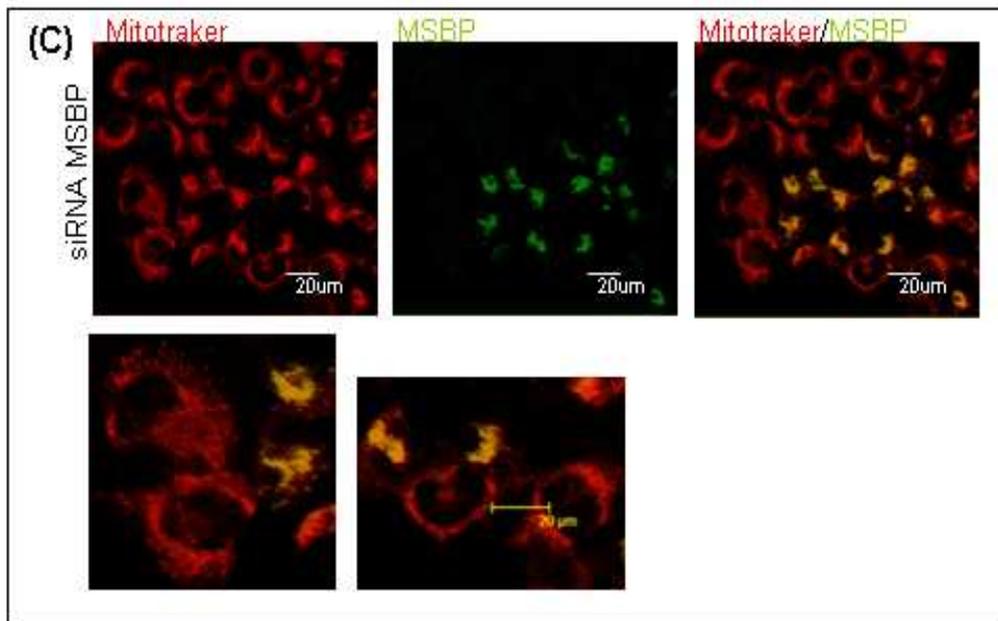
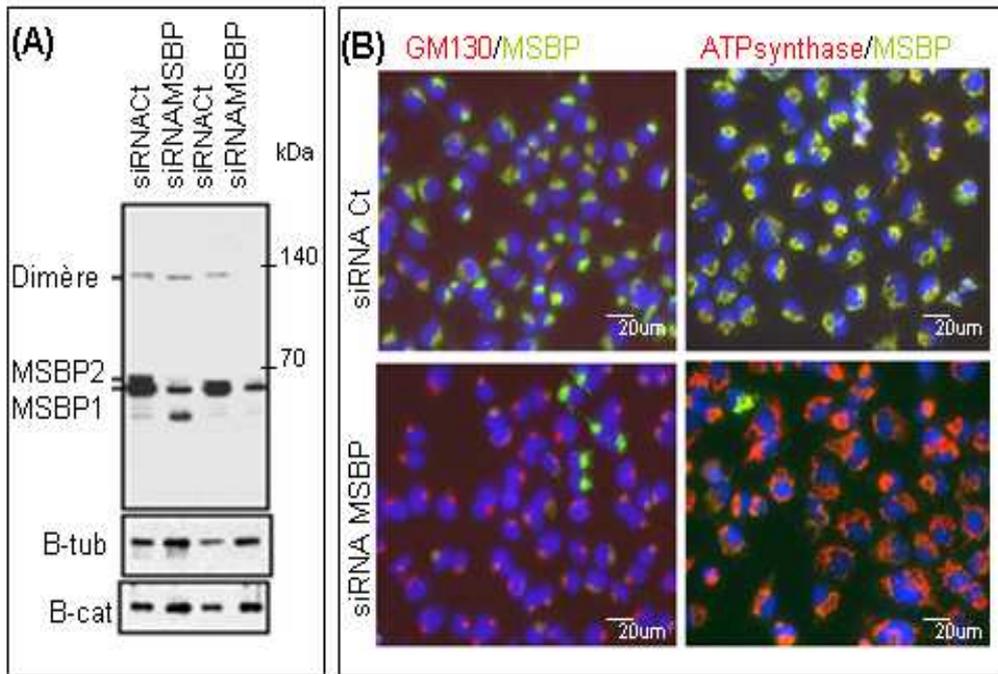


Figure 41 : Dans les cellules U373, l'invalidation de MSBP diminue l'interaction des mitochondries avec un centre d'ancrage périnucléaire des mitochondries.

- (A) L'expression de MSBP1 et MSBP2 est fortement réduite par l'utilisation de siRNA. La quantité de protéines MSBP est évaluée par Western blot à l'aide de l'anticorps N-ter à 3 et 6 jours après transfection d'un siRNA dirigé contre MSBP (siRNA MSBP), ou d'un siRNA dirigé contre aucune cible (siRNA CT). Les marqueurs β -tubuline (B-tub) et β -caténine (B-cat) sont utilisés pour contrôler la quantité d'extrait déposés.
- (B) L'invalidation de MSBP induit une dispersion des mitochondries dans les cellules U373. La distribution subcellulaire des mitochondries est observée en immunofluorescence dans différentes conditions : après transfection d'un siRNA dirigé contre MSBP (siRNA MSBP), ou d'un siRNA dirigé contre aucune cible (siRNA CT). L'ATP synthase est un marqueur de la mitochondrie. Le GM130 est utilisé pour montrer l'accumulation des mitochondries autour d'un centre d'organisation périnucléaire dans les cellules U373 contrôles. L'expression de la protéine MSBP est détectée à l'aide de l'anticorps N-ter. La dernière ligne est un agrandissement.
- (C) Après transfection d'un siRNA dirigé contre MSBP, la distribution des mitochondries est analysée au microscope confocal. L'immunomarquage MSBP est obtenu à l'aide de l'anticorps N-ter, les mitochondries sont visualisées à l'aide du mitotrker. La dernière ligne est un agrandissement.
- (D) L'invalidation de MSBP n'altère pas le métabolisme mitochondrial. Le réactif WST1 (ROCHE) permet de mesurer sur des cellules vivantes l'activité de la succinate-tetrazolium reductase (Hopper, 1997), une enzyme de la chaîne respiratoire mitochondriale. Ensuite les mêmes cellules sont fixées et colorées au cristal violet pour mesurer le nombre relatif de cellules par unité de surface. La densité de l'activité mitochondriale est alors ramenée à la densité cellulaire dans différentes conditions : après transfection d'un siRNA dirigé contre MSBP (siRNA MSBP), ou d'un siRNA dirigé contre aucune cible (siRNA CT).

L'inhibition de l'activité ATPase de MSBP, empêche la libération des mitochondries de leur site d'ancrage périnucléaire.

L'invalidation de MSBP par siRNA suggère que l'expression de cette protéine est nécessaire pour une distribution correcte des mitochondries. Pour confirmer l'implication de la protéine MSBP dans la distribution subcellulaire des mitochondries, nous avons décidé de perturber son activité, et pour cela, d'utiliser une construction dans laquelle la partie C-terminale de la protéine MSBP, qui contient le site de fixation et d'hydrolyse de l'ATP, est délétée (construction 1-287). Dans une telle construction ne subsiste que le domaine N-terminal, domaine qui dans la famille AAA est connu pour être le site de fixation des substrats.

Suite à la transfection d'une telle construction dans la lignée gliale U373, la distribution subcellulaire des mitochondries est analysée. De façon surprenante, lorsqu'une telle

construction est transfectée dans les cellules U373, le phénotype inverse de celui des siRNA est observé: dans les cellules qui surexpriment la construction, l'agrégation des mitochondries à un pôle du noyau est renforcée.

Afin de rendre ce phénotype plus évident, un nouveau type cellulaire a été choisi comme modèle d'étude, les cellules Hela. La figure 42(A) justifie le choix de ce modèle cellulaire, les cellules Hela étant plus adaptées que les cellules U373 pour observer le regroupement des mitochondries en immunofluorescence. La distribution des mitochondries est analysée en immunofluorescence à l'aide de l'anticorps N-terminal, dirigé contre une protéine mitochondriale, MSBP, dont nous avons préalablement montré que le marquage recouvre parfaitement celui des mitochondries. Contrairement aux cellules U373, où les mitochondries s'agrègent à un pôle du noyau autour d'un centre organisateur caractérisé par le marqueur GM130, dans les cellules Hela contrôles, la distribution des mitochondries tout autour du noyau présente une distribution radiaire (figure 42A).

Dans un second temps, toujours dans les cellules Hela la surexpression des protéines MSBP est visualisée à l'aide de l'anticorps N-terminal, la distribution des mitochondries analysée à l'aide du marqueur F1 (figure 42B). Dans les cellules non-transfectées, ou les cellules transfectées par la protéine MSBP sauvage, les mitochondries présentent une distribution radiale tout autour du noyau. La surexpression de la protéine MSBP sauvage est donc sans effet sur la distribution des mitochondries. Dans ces cellules la surexpression de la construction 1-287 induit au contraire une nette agrégation des mitochondries à un pôle du noyau (figure 42B). Lorsqu'une mutation ponctuelle est effectuée dans le Walker A, site de fixation et d'hydrolyse de l'ATP, un phénotype similaire à la construction 1-287 est observé : les mitochondries s'accumulent de manière asymétrique à un pôle du noyau. L'activité ATPase apparaît donc essentielle pour la libération des mitochondries de ce centre organisateur périnucléaire.

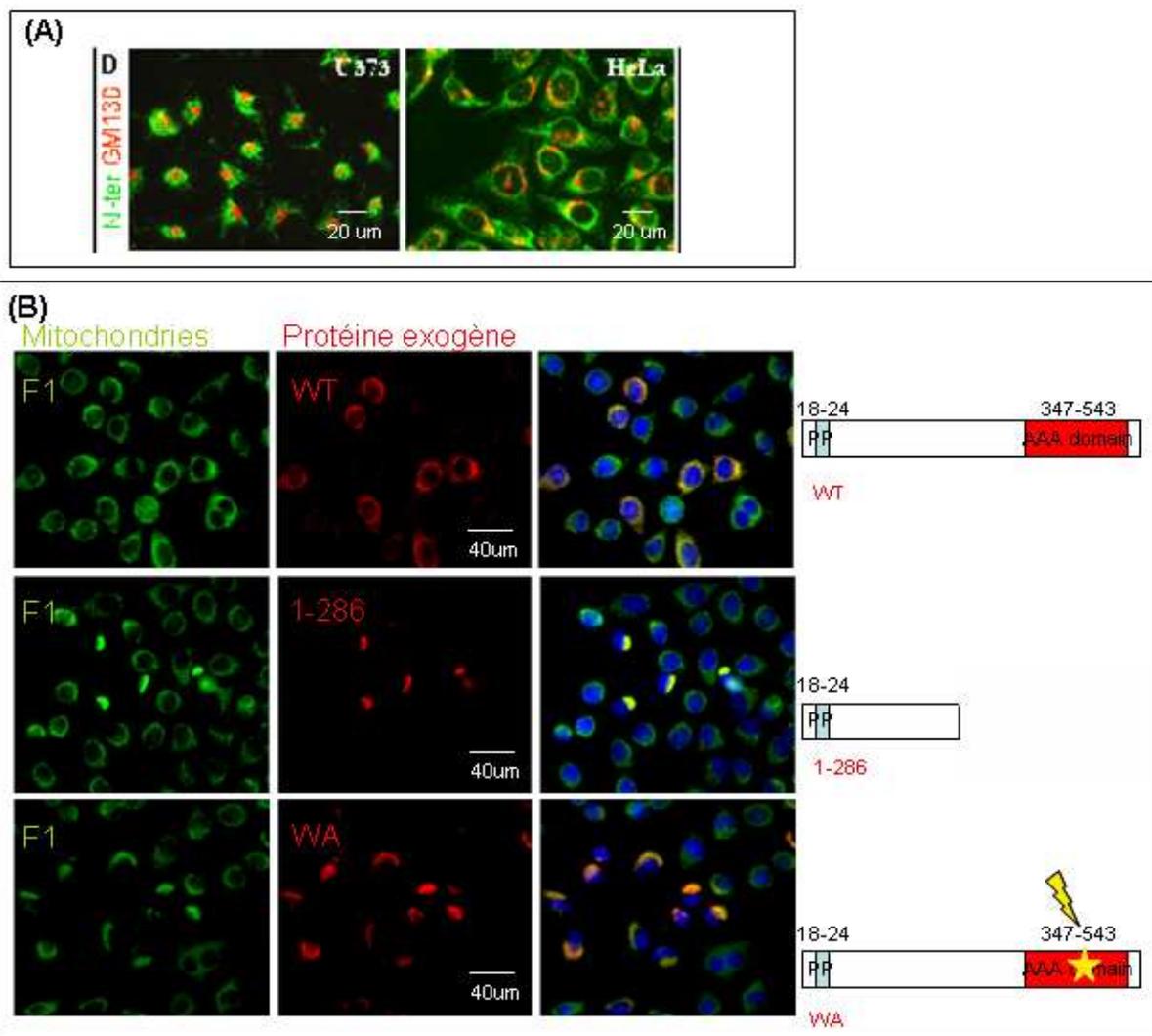


Figure 42 : Dans les cellules Hela, la délétion du domaine ATPase de MSBP, ou une mutation ponctuelle dans le site ATPase, empêche la libération des mitochondries d'un centre d'organisation périnucléaire.

(A) Comparaison de la distribution des mitochondries dans les cellules U373 et les cellules Hela. La distribution subcellulaire des protéines MSBP1 (anticorps N-ter) et du marqueur GM130 est observée en immunofluorescence.

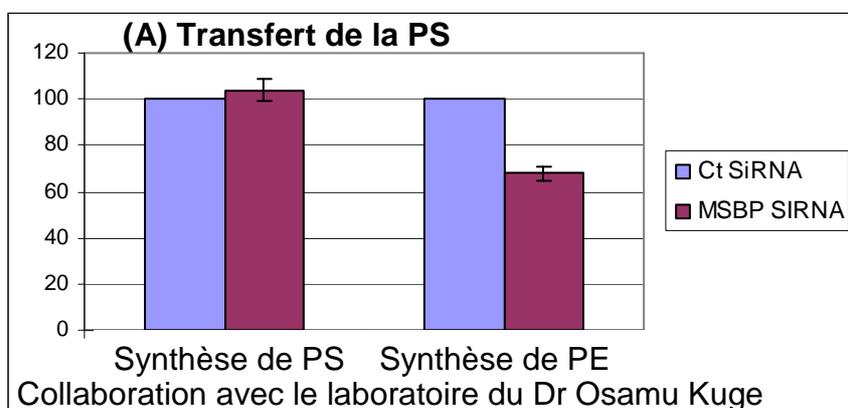
(B) La délétion du domaine ATPase de MSBP, ou une mutation ponctuelle dans le site ATPase, induit une accumulation asymétrique et périnucléaire des mitochondries. Les cellules sont transfectées avec les constructions représentées de façon schématique panneau de droite. La construction WA correspond à une mutation ponctuelle dans le Walker A, une lysine est remplacée par un glutamate. Après 48h, les cellules sont fixées au PFA, perméabilisées à l'acétone, et analysées en immunofluorescence avec un anticorps anti F1 ATP synthase (F1), marqueur mitochondrial, et un anticorps dirigé contre l'épitope N-terminal de MSBP. Les trois dernières lignes sont des agrandissements.

Ainsi l'invalidation de l'expression de la protéine MSBP par siRNA, ou l'invalidation de son activité ATPase, ont des effets opposés. La protéine MSBP est nécessaire pour l'organisation

des mitochondries autour d'un centre organisateur, tandis que son activité ATPase est nécessaire pour la libération des mitochondries de ce centre organisateur péri-nucléaire.

L'invalidation de l'expression de MSBP s'accompagne d'une diminution des interactions physiques et du transfert de la PS entre le RE et les mitochondries.

La S100B a été identifiée comme un régulateur positif du transfert de la phosphatidylsérine (PS) du RE vers la mitochondrie (Kuge et al., 2001). Nous avons cherché à savoir si la cible mitochondriale de la S100B, MSBP, pourrait être l'effecteur de la S100B dans la régulation de ce transport. Dans cette étude, la phosphatidylethanolamine (PE), produit mitochondrial de la PS transférée du RE vers la mitochondrie, est utilisée comme un marqueur du transfert de la PS (figure 43A). Une collaboration avec l'équipe du Dr Osamu Kuge a permis de montrer qu'après transfection d'un siRNA spécifiquement dirigé contre MSBP une chute de la synthèse de PE est observée par rapport aux conditions contrôles où un siRNA sans cible spécifique est transfecté. En revanche le taux de synthèse de PS est inchangé. La chute de synthèse de PE ne résulte donc pas d'une chute de la synthèse de son précurseur la PS. Suite à l'invalidation de MSBP, cette chute du marqueur PE résulte donc d'une diminution du transfert de son précurseur, la PS, du RE vers la mitochondrie. La protéine MSBP est donc l'effecteur de la S100B dans le transfert de la PS du RE vers la mitochondrie.



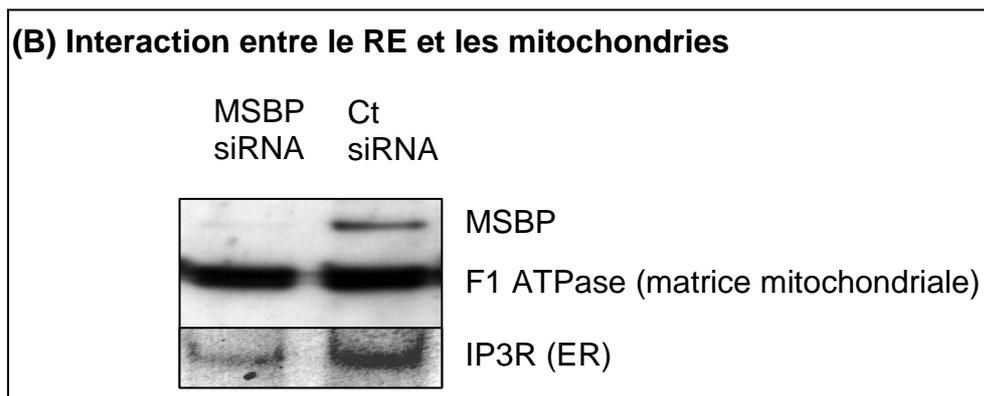


Figure 43 : L'invalidation de MSBP induit une rupture des interactions et une diminution du transfert de la PS entre le RE et les mitochondries dans les cellules U373.

(A) Diminution du transfert de la PS du RE vers les mitochondries suite à l'invalidation de l'expression de MSBP par siRNA. La PE synthétisée aux mitochondries à partir de la PS transférée du RE est utilisée comme un marqueur du transfert de la PS du RE vers les mitochondries.

(B) Rupture des interactions entre le RE et les mitochondries suite à l'invalidation de l'expression de MSBP par siRNA. Un extrait de mitochondries brutes est préparé, et la quantité de RE qui lui est associé est analysée à l'aide du marqueur IP3R. Le marqueur F1, mitochondrial, permet de contrôler que la quantité de mitochondries préparées est correctement normalisée. Dans les conditions contrôles, un siRNA sans cible connue est transféré.

Or ce transfert de la PS nécessite une interaction physique entre ces deux organelles. Nous avons donc cherché à savoir si la chute du transfert de PS entre le RE et les mitochondries suite à l'invalidation de MSBP pouvait résulter d'une rupture des interactions physiques entre le RE et les mitochondries. Il est connu que lorsqu'un extrait brut de mitochondries est préparé, une fraction du RE impliquée dans le transfert de la PS, les MAMS (Mitochondria Associated Membranes), reste associée aux mitochondries. Cinq jours après la transfection de siRNA contrôles sans cible spécifique, ou de siRNA spécifiquement dirigés contre MSBP, des mitochondries brutes sont préparées par centrifugation différentielle. La même quantité de mitochondrie est préparée dans ces deux conditions comme confirmé en Western blot à l'aide du marqueur mitochondrial la F1 ATPase. Dans des conditions contrôles, où un si RNA sans cible spécifique est transféré, nous confirmons ici en Western Blot à l'aide du marqueur des MAM, l'IP3R, qu'une fraction du RE reste physiquement associée aux mitochondries brutes. En revanche lorsqu'un siRNA est spécifiquement dirigé contre MSBP, le marqueur IP3R permet de montrer une nette diminution de la fraction de MAM associée au RE. La diminution du transfert de PS entre le RE et les mitochondries suite à l'invalidation de MSBP résulte donc d'une rupture des interactions physiques entre ces deux organelles.

Expression des protéines MSBP dans les gliomes

MSBP2 : un marqueur qui permet de distinguer les oligodendrogliomes des glioblastomes

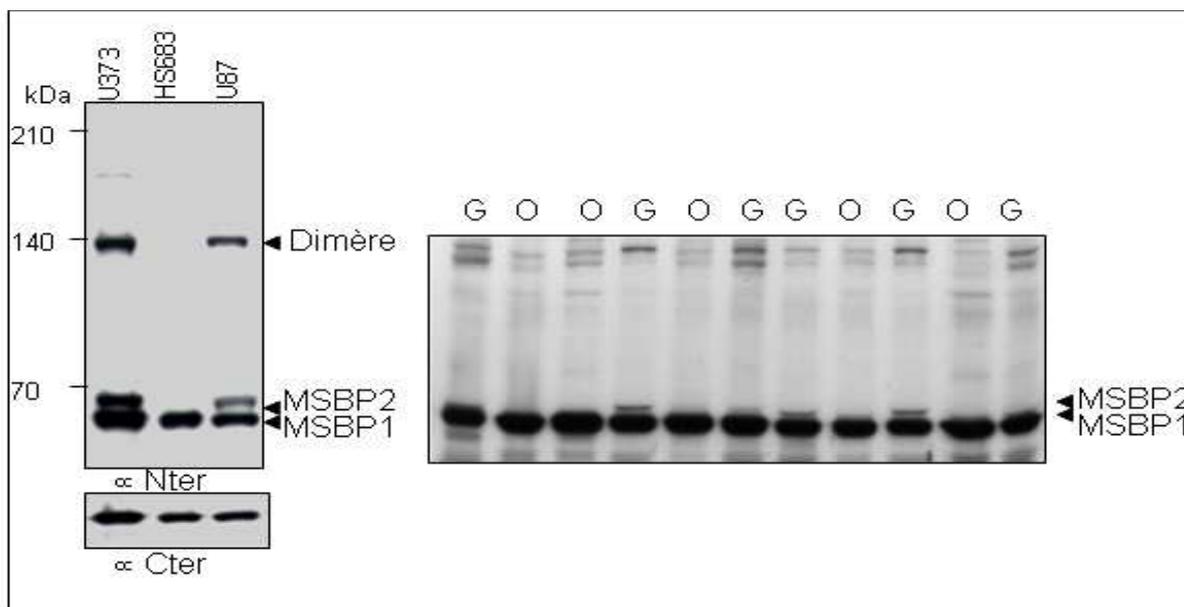


Figure 44 : MSBP2 n'est pas détectée dans les oligodendrogliomes comparés au glioblastomes

- (A) MSBP2 n'est pas détectée dans la lignée oligodendrogliale HS683. L'expression des protéines MSBP1 et MSBP2 est analysée à l'aide des anticorps N-ter et C-ter dans des extraits protéiques totaux issus de trois lignée gliales : U373 (astrocytome), U87 (astrocytome), et HS683 (oligodendrogliome).
- (B) MSBP2 n'est détectée que dans des glioblastomes comparés aux oligodendrogliomes. L'expression des protéines MSBP1 et MSBP2 est analysée dans des extraits protéiques totaux issus de biopsies à l'aide de l'anticorps N-terminal. Glioblastome (G), Oligodendrogliomes (O).

Dans 80% des cas, les oligodendrogliomes se caractérisent au niveau moléculaire par la perte d'hétérozygotie (LOH : Loss Of Heterozygoty) au locus 1p36.33 (Perry, 2001; Reifenberger et al., 1994), locus qui porte entre autres les gènes MSBP1 et MSBP2. Lorsque par Western Blot différentes lignées gliales sont analysées, U373 et U87, lignées issues de glioblastomes, HS683, lignée issue d'oligodendrogliomes, l'expression de l'épitope C-terminal de MSBP1 est ubiquitaire, en revanche MSBP2 n'est détectable que dans les glioblastomes (figure 44A). Comparée au glioblastomes, la disparition de MSBP2 dans la lignée oligodendrogliale suggère que la protéine MSBP2 pourrait être un marqueur pour distinguer les oligodendrogliomes des glioblastomes.

Pour confirmer ces résultats, l'expression des protéines MSBP1 et MSBP2 a été analysée de façon plus systématique à partir de biopsies classées comme des glioblastomes ou des oligodendrogliomes sur des critères histologiques (figure 44B). Les biopsies ont été obtenues auprès du laboratoire du docteur Marie Françoise Belin. L'expression de MSBP1 s'avère

ubiquitaire. En revanche, bien que faiblement exprimée, la protéine MSBP2 est détectée dans les glioblastomes mais pas dans les oligodendrogliomes.

La protéine MSBP2 apparaît donc comme un marqueur qui permet de distinguer les oligodendrogliomes comparés aux glioblastomes. Par la suite, nous avons cherché à savoir si l'absence d'expression de MSBP2 dans les oligodendrogliomes pouvait résulter d'une délétion du gène MSBP2. Pour simplifier l'approche, nous avons commencé par nous intéresser au statut de ce gène dans la lignée dérivée d'oligodendrogliomes HS683.

Délétion homozygote du gène codant pour MSBP2 dans la lignée oligodendrogliale HS683

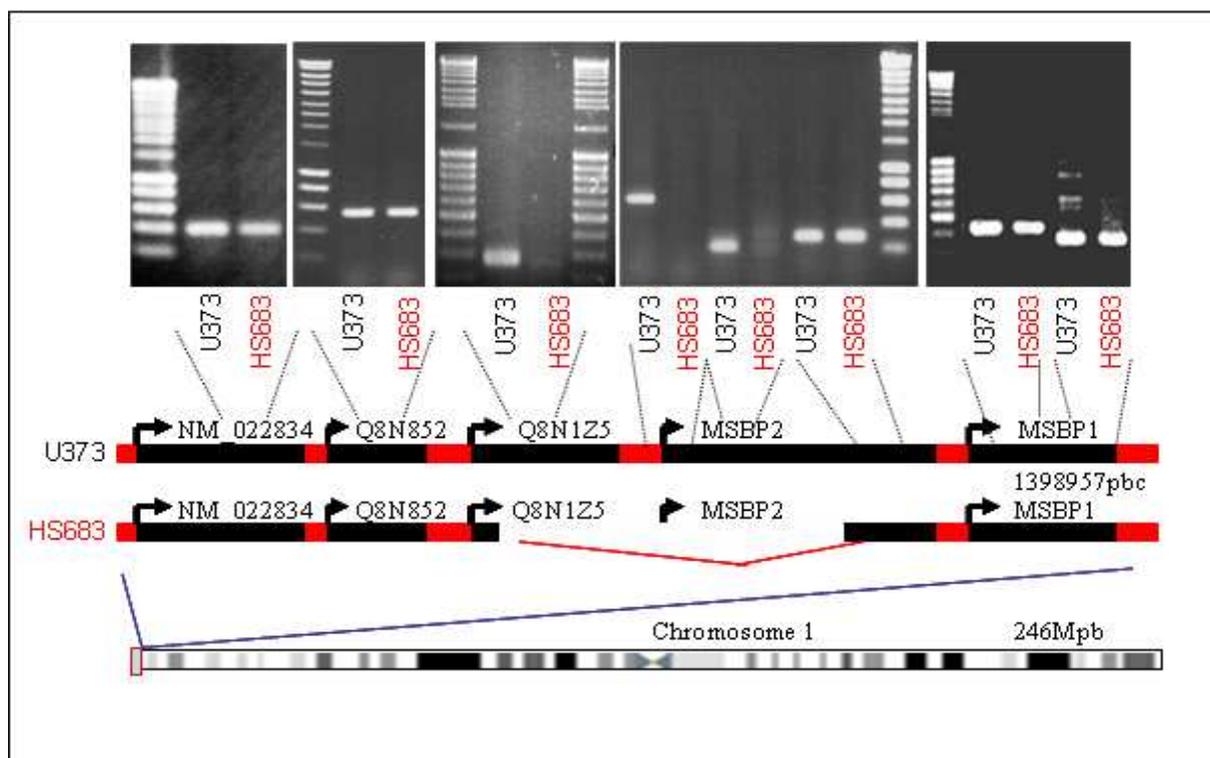


Figure 45 : Une délétion homozygote touche la partie 5' du gène MSBP2 dans la lignée HS683.

Panneau du haut. La présence de différents gènes localisés au locus 1p36.33 est analysée par PCR génomique dans la lignée U373, et HS683.

Panneau du bas : Représentation schématique de la localisation des différents gènes (en noir) analysés par PCR génomique. La zone distale du chromosome 1p de la lignée HS683 est caractérisée par une délétion homozygote dont l'étendue se restreint aux gènes Q8N1Z5 et à la partie 5' du gène MSBP2.

Une LOH au locus 1p36.33 est déjà décrite dans la lignée HS683 dérivée d'un oligodendrogliome (Branle et al., 2002). Ce qui signifie qu'un des deux allèles de MSBP2 est déjà délété. Pour expliquer l'absence d'expression de MSBP2 dans cette lignée nous nous sommes intéressés au statut du second allèle. Pour cela des PCR génomiques ont été effectuées dans la lignée HS683, la lignée U373 étant utilisée comme contrôle positif (figure 45). Contrairement à la lignée U373, où tous les gènes du locus 1p36.33 testés sont présents, dans la lignée HS683 ne sont pas détectés : la partie 5' du gène MSBP2, comprenant le promoteur et le premier exon au moins, ainsi que la partie 3' du gène Q8N1Z5 adjacent à MSBP2 côté distal du chromosome. Nous avons ainsi pu montrer une délétion homozygote très localisée dans la lignée dérivée d'oligodendrogliome HS683, délétion qui ne recouvre que deux gènes : la partie 5' et le promoteur du gène MSBP2 ainsi que le gène Q8N1Z5. Ce résultat suggère qu'au cours du développement tumoral, la pression de sélection a favorisé la délétion homozygote de MSBP2, et que l'inactivation de MSBP2 pourrait participer à la transformation cellulaire. Dans un second temps, nous avons cherché à savoir si l'inactivation expérimentale de l'expression des gènes MSBP pourrait participer à la transformation cellulaire.

Invalidation de l'expression des protéines MSBP et transformation cellulaire

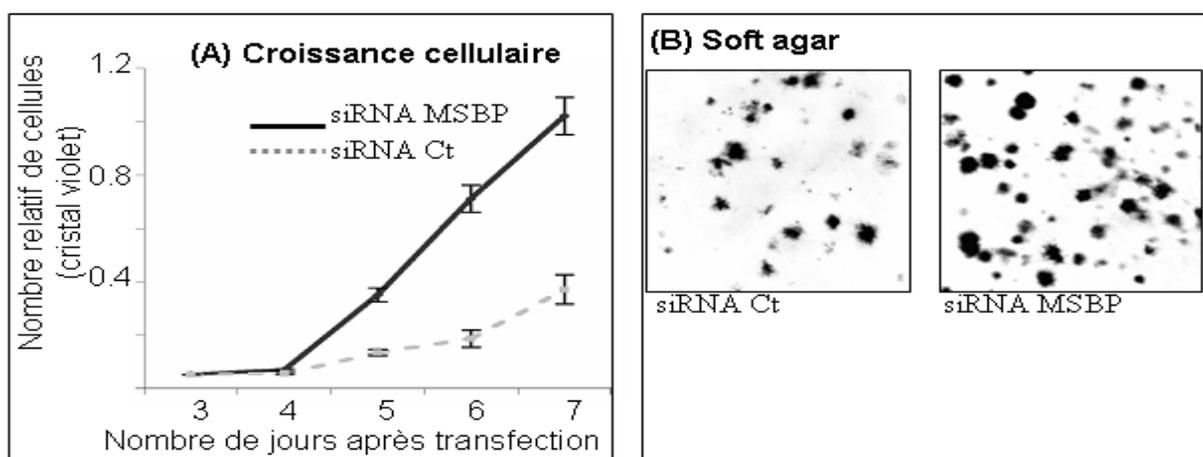


Figure 46 : L'inactivation de MSBP favorise la croissance cellulaire dans les cellules U373.

(A) Courbe de croissance des cellules U373. Le nombre relatif de cellules par unité de surface est quantifié à l'aide du cristal violet. Chaque valeur correspond à une moyenne sur 6 points. Des résultats similaires ont été obtenus de manière indépendante 3 fois. Dans les conditions contrôles, un siRNA sans cible connue est transfecté (siRNA Ct), sinon des siRNA dirigés contre la protéine MSBP sont utilisés (siRNA MSBP).

(B) Croissance des cellules en soft agar. Quatre jours après la transfection du siRNA, les cellules sont cultivées en soft agar. Dans les conditions contrôles, un siRNA sans cible connue est transfecté (siRNA Ct), sinon des siRNA dirigés contre la protéine MSBP sont utilisés (siRNA MSBP). Après 10 jours de croissance en soft agar les colonies sont photographiées.

Pour tester l'implication éventuelle des protéines MSBP dans la transformation cellulaire une approche d'inactivation par siRNA a été utilisée (figure 46). Pour cela des cellules gliales qui expriment fortement ces deux protéines ont été choisies : la lignée U373. Nous nous sommes intéressés à l'impact de cette inactivation sur la croissance cellulaire, un siRNA sans cible spécifique étant utilisé comme contrôle négatif. Cette inactivation spécifique de l'expression de MSBP favorise la prolifération ou la survie cellulaire : le nombre de cellules est presque multiplié par trois après cinq jours d'inactivation par rapport aux conditions contrôles (figure 46A). L'inactivation de MSBP favorise la croissance en soft agar dans le même ordre de grandeur (figure 46B). L'inactivation de MSBP dans les cellules U373 favorise donc la prolifération et la croissance cellulaire indépendante de l'ancrage en Soft Agar. Une prolifération accrue et une capacité de survie en suspension sont deux critères de transformation, ces résultats suggèrent que l'inactivation de MSBP dans des cellules gliales pourrait participer à la transformation cellulaire.

Surexpression des protéines MSBP et transformation cellulaire

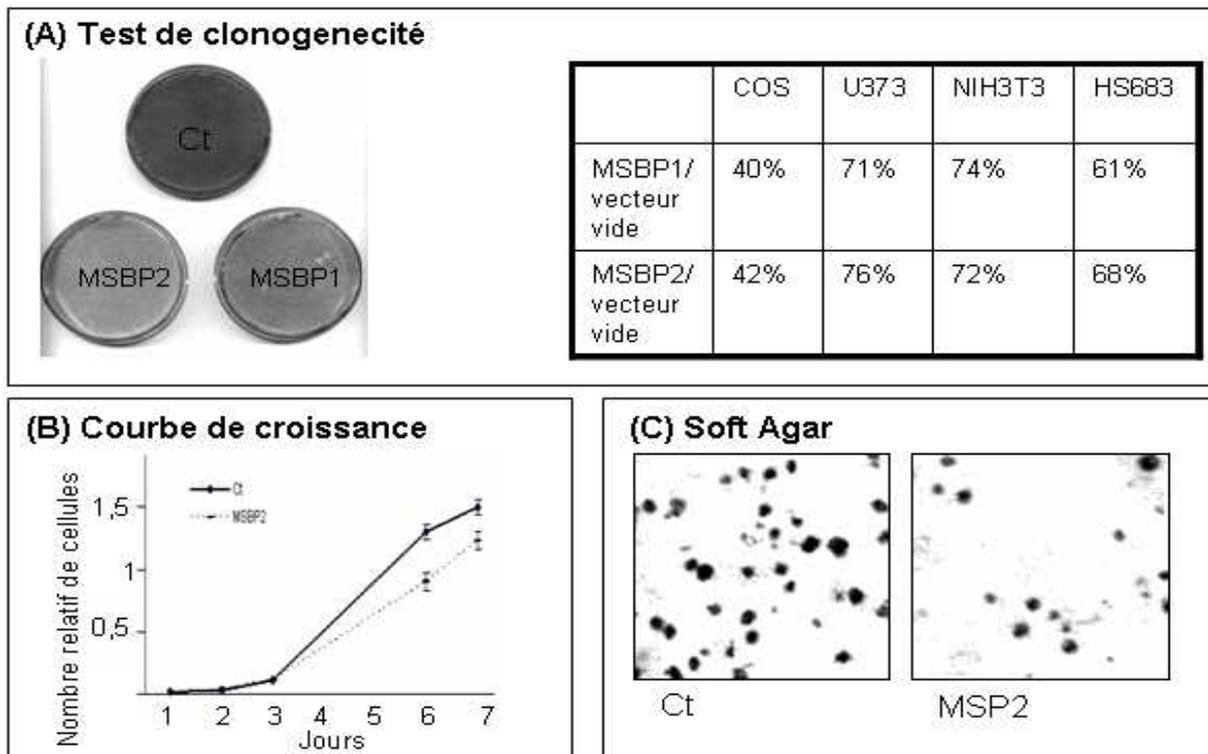


Figure 47 : La surexpression des protéines MSBP inhibe la croissance.

- (A) La surexpression de MSBP2 inhibe le nombre de clones formés en test de clonogénéité. Après la transfection des vecteurs portant les cDNA codant pour MSBP2 ou MSBP1, ou d'un vecteur vide (Ct), le nombre de clones formé est analysé après 10 jours de sélection antibiotique. Panneau de gauche, les boîtes de cellules HS683 transfectées sont présentées après fixation et coloration.
- (B) Courbe de croissance d'un pool de cellules HS683 transfectées par un vecteur portant les cDNA codant pour MSBP2, ou un vecteur vide (Ct).
- (C) Colonies formées en soft agar par un pool de cellules HS683 transfectées par un vecteur portant les cDNA codant pour MSBP2, ou d'un vecteur vide (Ct). Après 10 jours de croissance en soft agar les colonies sont photographiées.

Par ailleurs nous avons également analysé les effets de la surexpression des protéines MSBP (figure 47). Tout d'abord, un test de clonogénéité a été effectué dans différentes lignées : COS, NIH3T3, U373, HS683. Pour cela, un « pool » de cellules transfectées par un vecteur vide, ou un vecteur porteur du cDNA de MSBP1 ou MSBP2, est soumis après 48h de transfection à une sélection antibiotique dirigé contre le gène de résistance porté par le vecteur. Quelle que soit la lignée cellulaire, après 12 jours de sélection antibiotique, la surexpression de MSBP1 ou MSBP2 induit une diminution du nombre de clones formés, le nombre de clones est notamment réduit de plus de moitié dans les cellules COS (figure 47A).

Nous avons ensuite décidé d'analyser plus en détail l'effet de cette surexpression sur la prolifération et la croissance en soft agar. Pour cela, afin d'amplifier l'effet de la surexpression, nous avons choisi une lignée gliale qui exprime faiblement les protéines MSBP, la lignée HS683. Bien que faible, l'analyse de la courbe de croissance montre une diminution de la prolifération dans les cellules HS683 qui surexpriment MSBP2 (Figure 47B). Par ailleurs en soft agar il existe une diminution d'un facteur deux du nombre de colonies formées (figure 47C).

La surexpression de MSBP2 a donc des effets parfaitement opposés à ceux de l'inactivation des protéines MSBPs : une diminution de la prolifération et de la croissance indépendante de l'ancrage.

Discussion

Localisation mitochondriale de MSBP

Les études précédentes, des approches globales de fractionnements biochimiques et de protéomique qui ne portaient pas spécifiquement sur MSBP, étaient contradictoires sur la localisation subcellulaire de MSBP. La protéine était présentée comme se localisant à la membrane plasmique (Geuijen et al., 2005), aux chromosomes interphasiques (Morrison et al., 2002), ou à la mitochondrie (Da Cruz et al., 2003; Mootha et al., 2003). Dans tous les types cellulaires utilisés au cours de notre étude, que ce soit par des approches d'immunofluorescence (protéines endogènes ou protéines surexprimées avec une étiquette myc), ou lors de fractionnements subcellulaires en biochimie, MSBP est toujours associée aux mitochondries et n'a jamais été observée associée à d'autres compartiments cellulaires.

Bien plus, nous avons montré que la protéine MSBP est une protéine mitochondriale transmembranaire intégrale, qu'elle présente un épitope N-terminal exposé côté cytosolique, et un domaine C-terminal de 35 kDa, comprenant le site de fixation et d'hydrolyse de l'ATP, protégé à l'intérieur de la mitochondrie (figure 48A).

Le mode le plus classique d'adressage des protéines à la mitochondrie utilise des séquences N-terminales clivables. L'élimination de cette séquence a permis de montrer que l'adressage de MSBP requiert un système alternatif. Ce système d'adressage alternatif est en accord avec la localisation de MSBP à la membrane mitochondriale externe : aucune protéine de la membrane externe décrite à ce jour, ne présente de séquence d'adressage N-terminale clivable. Par ailleurs, des travaux montrent que les séquences 3' UTR des ARNm de certaines protéines mitochondriales permettent leur traduction localisée, à proximité des mitochondries (Marc et al., 2002). Nous avons montré ici que la délétion de sa séquence 3' UTR dans la construction avec une étiquette myc en C-terminal, n'empêche pas l'adressage de MSBP aux mitochondries.

Enfin la capacité de MSBP à interagir avec la membrane interne suggère que MSBP est une protéine de la membrane externe localisée aux sites d'interactions avec la membrane interne. Des études montrent que ces domaines sont enrichis aux sites d'interactions des mitochondries avec le RE (Ardail et al., 1993; Ardail et al., 1991; Gaigg et al., 1995), des micro-domaines impliqués dans le transfert du calcium (Rapizzi et al., 2002; Shoshan-Barmatz et al., 2004), des nucléotides (Wilding et al., 2006) et de la PS (Hovius et al., 1992; Vance and Steenbergen, 2005) (Figures 21 et 22). Or nous avons montré que la protéine MSBP est nécessaire pour le maintien des interactions entre le RE et les mitochondries, ainsi

que pour le transfert de PS entre ces deux organelles. La localisation de MSBP est donc en parfait accord avec sa fonction cellulaire.

MSBP et l'ancrage périnucléaire des mitochondries

La mauvaise distribution subcellulaire des mitochondries peut être la conséquence secondaire d'un état métabolique altéré comme le mauvais fonctionnement de la chaîne respiratoire, ou une chute du potentiel membranaire. Suite à l'invalidation de l'expression de MSBP par un siRNA, aucune modification majeure de l'état métabolique des mitochondries n'a été observée, et la prolifération cellulaire n'est pas réduite. La modification observée dans la distribution des mitochondries résulte donc d'une implication plus directe de la protéine MSBP dans la distribution subcellulaire des mitochondries.

Dans les cellules U373, contrairement aux cellules Hela, les mitochondries s'accumulent de façon asymétrique à un pôle du noyau dans une forte proportion de cellules. L'invalidation de MSBP s'accompagne alors d'une libération des mitochondries de ce qui apparaît comme un centre organisateur périnucléaire des mitochondries : les mitochondries se dispersent vers la périphérie. La présence de MSBP apparaît donc comme nécessaire à l'ancrage des mitochondries sur ce centre organisateur (figure 48B). Au contraire, l'inhibition de l'activité ATPase, par la délétion du site de fixation de l'ATP ou par une mutation ponctuelle d'un résidu impliqué dans la fixation de l'ATP, favorise l'agrégation des mitochondries autour de ce centre organisateur (figure 48B). L'invalidation de MSBP, ou l'inhibition de son activité ATPase a donc des effets complètement opposés. MSBP permet donc l'ancrage des mitochondries autour d'un centre organisateur à proximité du noyau, et son activité ATPase régule la libération des mitochondries de ce centre organisateur.

Une analyse de la bibliographie montre que d'autres approches génétiques ont également abouti à l'agrégation des mitochondries à un pôle du noyau. Ainsi, l'invalidation d'un moteur moléculaire, la kinésine, qui permet le transport antérograde des mitochondries (Tanaka et al., 1998; Wu et al., 1998), ou l'invalidation de l'une ou l'autre des protéines adaptatrices, Milton ou Miro, qui permettent l'ancrage des mitochondries sur ce moteur, aboutissent à une telle agrégation (Glater et al., 2006; Guo et al., 2005). D'autre part le traitement de cellules Hela par la staurosporine, qui induit l'entrée en apoptose de ces cellules, s'accompagne d'une réorganisation des microtubules dépendante de la phosphorylation de Tau et d'une accumulation des mitochondries autour du centrosome (Darios et al., 2005). Ainsi toutes ces études soulignent l'importance du mouvement des mitochondries le long de ce réseau de microtubules dans la régulation de la distribution des mitochondries par rapport à un centre

organisateur périnucléaire des mitochondries. Mais ce centre organisateur reste à identifier, la zone d'accumulation des mitochondries est beaucoup plus large que le centrosome, très ponctuel, et qui n'apparaît que comme « un centre de gravité » dans l'équilibre entre les mouvements antérogrades et rétrogrades des mitochondries le long du réseau de microtubules. La distribution des mitochondries résulte également de leur immobilisation, leur ancrage, à des sites spécifiques (Hollenbeck and Saxton, 2005). Les mécanismes moléculaires qui permettent l'ancrage des mitochondries à proximité d'organelles comme le RE restent à identifier.

La comparaison de la protéine MSBP avec la protéine Miro peut s'avérer intéressante. La protéine adaptatrice Miro qui établit les contacts entre la mitochondrie et un moteur des microtubules, est essentielle pour les déplacements antérogrades des mitochondries (Fransson et al., 2003; Fransson et al., 2006; Frederick et al., 2004; Guo et al., 2005). Les protéines MSBP et Miro partagent des points communs. Ce sont des protéines de la membrane externe des mitochondries, et elles sont transmembranaires intégrales. Si MSBP interagit avec une protéine à mains EF, sites de fixation du calcium, la S100B, la séquence de Miro porte également des mains EF. De même que la protéine MSBP possède un domaine ATPase, Miro possède un site GTPase. Cependant son site GTPase est exposé côté cytosolique, contrairement à MSBP dont le site ATPase est protégé à l'intérieur de la mitochondrie. Mais des différences beaucoup plus importantes apparaissent d'un point de vue fonctionnel. Certes, les mutations du domaine GTPase ou main EF de Miro (Fransson et al., 2006), ou la mutation du domaine ATPase de MSBP induisent toutes une accumulation périnucléaire des mitochondries. Mais, la surexpression de la protéine MSBP est sans effet apparent, tandis que la surexpression de Miro induit une accumulation des mitochondries à la périphérie (Guo et al., 2005). Bien plus, si l'invalidation de la protéine Miro a un effet similaire aux mutations ponctuelles, au contraire l'invalidation de l'expression de MSBP et la mutation de son site ATPase ont des effets opposés. Dans ce contexte, la protéine MSBP s'avère originale. Les moteurs moléculaires kinésines, les protéines adaptatrices Milton et Miro, sont impliqués dans la régulation du mouvement des mitochondries, tandis que la protéine MSBP semble impliquée dans la régulation de l'interaction des mitochondries avec un centre organisateur périnucléaire.

Perspectives

La distribution proximo distale des mitochondries par rapport au noyau, les phénomènes de fusion/fission des mitochondries, les propriétés de déplacement des mitochondries sont très étudiés. En revanche, les mécanismes moléculaires qui permettent l'ancrage des mitochondries à des sites précis et leurs interactions avec d'autres organelles restent peu décrits. Par ailleurs, bien qu'observée, la répartition des mitochondries autour du noyau qui peut être symétrique (symétrie radiale), ou asymétrique (accumulation à un pôle), n'est pas étudiée. Cette asymétrie pourrait être essentielle dans les cellules polarisées, lors de la migration cellulaire, ou lors de la division asymétrique. D'autre part, les mitochondries jouent un rôle essentiel dans la régulation de la propagation des signalisations calciques. Des constructions mutantes de MSBP, comme la construction 1-287, pourraient s'avérer de très bons outils pour analyser les relations entre distributions mitochondriales, interactions des mitochondries avec les autres réservoirs à calcium, RE et membranes plasmiques, et les modifications de la signalisation calcique cellulaire.

Des modèles cellulaires comme les neurones ou les cellules pancréatiques, des cellules fortement polarisées, s'avèrent très intéressants pour l'étude de la distribution des mitochondries. Dans ces cellules la distribution des mitochondries est très hétérogène, et l'accumulation des mitochondries à des sites précis est essentielle pour la régulation locale de la production d'ATP ou l'homéostasie calcique. L'invalidation de MSBP, ou l'utilisation de protéines mutantes pourrait s'avérer intéressante dans ces modèles cellulaires.

Suite à l'invalidation de MSBP qui induit une modification de la distribution des mitochondries, une dispersion des mitochondries vers la périphérie, la vidéomicroscopie devrait permettre de montrer que le mouvement des mitochondries périphériques (cinétique, direction) n'est pas altéré, mais que seuls l'immobilisation et l'ancrage autour d'une structure périnucléaire sont modifiés.

Bien que le mécanisme moléculaire par lequel MSBP est impliquée dans la régulation de l'interaction des mitochondries avec un centre organisateur reste inconnu, des résultats préliminaires suggèrent que MSBP puisse interagir avec des composants du cytosquelette. Ainsi la construction MSBP 150-280 n'est plus localisée aux mitochondries, s'accumule dans des structures similaires au centre organisateur des mitochondries, et induit une libération des mitochondries de ce centre organisateur et leur dispersion vers la périphérie. Ceci suggère que cette protéine MSBP mutante, lorsqu'elle s'accumule au centre organisateur, masque le site d'ancrage de la protéine MSBP mitochondriale sauvage et empêche ainsi l'agrégation des mitochondries autour de ce centre organisateur. Si l'hypothèse de l'interaction de la protéine

MSBP avec un composant du cytosquelette s'avère juste, la prochaine étape est l'identification de ce composant. La construction pourrait alors être utilisée pour des expériences d'immunoprécipitation ou de « pull down ».

Interactions RE-mitochondries et transfert de la PS

Une étude précédente a montré que la S100B stimule de façon calcium et ATP dépendante le transfert de PS du RE vers les mitochondries (Kuge et al., 2001). Dans la présente étude, nous avons identifié une cible mitochondriale de la S100B qui présente les caractéristiques requises pour être l'effecteur de la S100B dans ce transport : c'est une ATPase dont l'interaction avec la S100B est calcium dépendante. Bien plus, l'inactivation de MSBP réduit fortement le transport de la PS. Il existe plusieurs explications au fait que l'inhibition du transfert de la PS ne soit pas complète. Tout d'abord une approche du type siRNA diminue fortement l'expression de la protéine, mais ne l'abolit pas complètement. Ensuite, une deuxième voie de biosynthèse pour la PE existe, la voie CDP-éthanolamine dans le RE (Henneberry et al., 2002; Kennedy, 1956; Vance, 1988). La voie de biosynthèse majoritaire varie d'un type cellulaire à l'autre (Kuge et al., 1986; Miller and Kent, 1986; Sundler and Akesson, 1975; Voelker, 1984; Zelinski and Choy, 1982) (figure 21). MSBP apparaît donc comme l'effecteur de la S100B dans la régulation du transfert calcium dépendant de la PS du RE à la mitochondrie.

Mais l'implication de MSBP dans le transport de la PS est en fait indirect, MSBP régule la distribution subcellulaire des mitochondries, et leurs interactions avec le RE, qui est indispensable pour le transfert de la PS. Une étude précédente avait montré en immunofluorescence que l'accumulation périnucléaire des mitochondries autour des centrosomes s'accompagne d'une augmentation du recouvrement entre le marquage du RE et le marquage des mitochondries (Darios et al., 2005). En accord avec ce résultat, nous montrons ici par une approche biochimique, qu'à l'inverse, une dispersion vers la périphérie des mitochondries, induite par l'inactivation de l'expression de MSBP, s'accompagne d'une diminution des interactions entre le RE et les mitochondries. Toutes les études précédentes qui montraient l'importance des interactions entre le RE et les mitochondries dans le transfert de la PS utilisaient des approches biochimiques. L'inactivation de MSBP est la première approche « génétique », qui montre par l'inactivation de l'expression d'une protéine par siRNA, que les contacts physiques étroits entre le RE et les mitochondries sont indispensables pour un tel transfert. Il avait été proposé que la S100B régule les interactions entre le RE et les

mitochondries (Vance and Steenbergen, 2005), nous avons identifié ici une cible de la S100B qui régule les interactions entre le RE et les mitochondries, et donc le transfert de la PS.

Perspectives

Des études complémentaires devraient permettre de confirmer que MSBP est l'effecteur de la S100B : en effet suite à l'invalidation de MSBP, la S100B ne devrait plus être capable de stimuler le transfert de PS.

Concernant le transfert de la PS, et les interactions entre le RE et les mitochondries, seule l'influence du siRNA a été étudiée, il reste à tester l'influence des protéines MSBP délétées ou mutées pour le site ATPase.

Spécificité de l'interaction directe entre la S100B et MSBP.

L'approche par Far Western, qui a permis l'identification de MSBP comme cible de la sonde S100B radiomarquée au ³⁵S, est originale. MSBP est la première cible de la S100B identifiée par cette approche. En Far Western, MSBP est la cible majeure reconnue par la S100B dans un échantillon protéique complexe : un extrait cellulaire total. Contrairement à d'autres techniques, comme les « pulldown S100B » ou les co-immunoprécipitations qui permettent l'identification de nombreuses cibles de la S100B, le Far Western permet d'identifier des cibles insolubles et semble être une technique plus stringente : dans ces conditions la S100B reconnaît de façon spécifique un nombre restreint de cibles. De plus la technique du Far Western permet d'affirmer que l'interaction entre la S100B et MSBP est directe, sans protéines adaptatrices intermédiaires.

De nombreuses protéines S100 partagent des cibles en commun. Ainsi la S100A1, protéine qui est la plus proche de la S100B avec 59 % d'identité stricte, est capable de former des hétérodimères avec la S100B (Deloulme et al., 2000), et interagit avec une dizaine de cibles communes à la S100B. Pourtant dans des expériences de S100B « pull down », la S100A1 est incapable de dissocier l'interaction entre la S100B et MSBP. Ce qui suggère que l'interaction entre la S100B et MSBP est de très haute affinité. De plus, une approche plus classique, comme la co-immunoprécipitation, confirme que les protéines S100B et MSBP endogènes sont capables d'interagir.

S100B : un senseur à calcium à l'interface MAM mitochondries.

Une analyse bibliographique montre que de nombreuses cibles de la S100B, une trentaine à ce jour, ont déjà été identifiées. Cependant pour toutes ces cibles l'interaction n'a été montrée qu'*in vitro* à des concentrations calciques nettement supérieures aux concentrations cytosoliques. L'implication commune de MSBP et de la S100B dans la régulation du transfert de la PS du RE vers les mitochondries, la localisation de MSBP à la membrane externe des mitochondries, aux zones de contacts entre les membranes externes et internes, connues pour être enrichies à l'interface mitochondries-RE, suggèrent que l'interaction calcium dépendante entre la S100B et MSBP a lieu à cette interface, où les concentrations calciques, de 15 à 100 μM (Csordas et al., 1999; Neher, 1998), sont en accord avec l'affinité de la S100B pour le calcium. Par ailleurs, les interactions entre les MAM et les mitochondries sont régulées par les concentrations calciques (Wang et al., 2000b), la S100B pourrait être le senseur à calcium qui régule ces interactions.

Les protéines de la famille AAA forment des oligomères, l'ATP interagissant à l'interface de deux monomères, l'inhibition de l'oligomérisation s'accompagne donc d'une inhibition de l'activité ATPase (Frickey and Lupas, 2004). La S100B inhibe la formation des oligomères de MSBP, membre de la famille AAA, et pourrait réguler ainsi son activité ATPase (figure 48A). Il a déjà été montré que la S100B peut inhiber l'oligomérisation de ses protéines cibles, notamment pour les filaments intermédiaires (Sorci et al., 1998), les microtubules (Sorci et al., 2000), ou la protéine p53 (Fernandez-Fernandez et al., 2005) par exemple.

Perspectives

Si le fonctionnement de la protéine MSBP est identique au mécanisme commun déjà décrit pour les autres membres de la famille AAA, alors l'inhibition de l'oligomérisation de MSBP par la S100B devrait s'accompagner d'une inhibition de son activité ATPase. La surexpression de la S100B devrait donc induire un phénotype identique à la surexpression des protéines MSBP mutées ou délétées pour leur site ATPase : un regroupement des mitochondries à un pôle du noyau (figure 48).

Cependant la difficulté de telles approches ne doit pas être sous-estimée. En plus de MSBP, la S100B interagit avec de nombreuses autres cibles. La S100B n'est qu'une protéine régulatrice dont la fonction peut être compensée, notamment par d'autres S100 comme la S100A1 avec laquelle elle partage de nombreuses cibles. Ainsi les souris transgéniques ou invalidées ne

présentent pas de phénotypes majeurs, mais seulement des phénotypes complexes révélés par des conditions de stress, vieillissement, épilepsie...

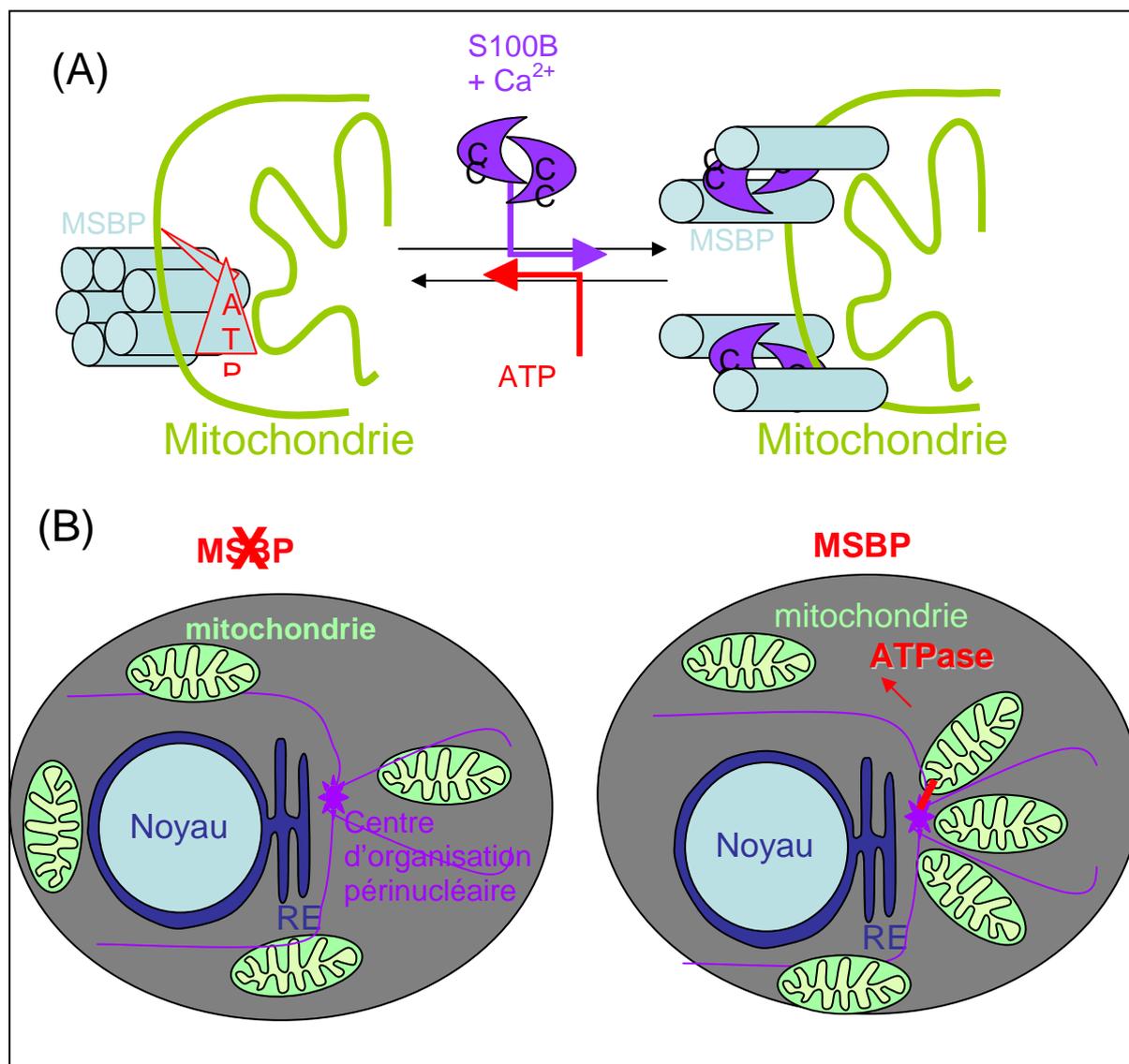


Figure 48 : modèles d'interprétation

(A) Régulation de l'activité de MSBP par la S100B.

La protéine MSBP est une protéine mitochondriale transmembranaire intégrale, dont le domaine N-terminal, site de fixation de la S100B, est exposé côté cytosolique, le côté C-terminal, porteur du site de fixation de l'ATP, protégé à l'intérieur de la mitochondrie. La protéine est localisée aux sites de contacts avec la membrane interne. Tous les membres de la famille AAA, à laquelle appartient MSBP, décrits à ce jour sont présents sous la forme d'hexamères, l'ATP étant fixé à l'interface entre deux monomères. L'oligomérisation est nécessaire à leur activité ATPase. La S100B qui inhibe l'oligomérisation de MSBP pourrait réguler ainsi son activité ATPase.

(B) Régulation de la distribution des mitochondries par la protéine MSBP.

La protéine MSBP est nécessaire pour l'ancrage des mitochondries autour d'un centre d'organisation périnucléaire. L'activité ATPase de MSBP régule la libération des mitochondries de ce centre organisateur. La S100B inhibe cette activité ATPase et favorise l'accumulation périnucléaire. Les interactions physiques et le

transfert de PS entre le RE et les mitochondries sont favorisés lorsque les mitochondries s'accumulent autour de ce centre organisateur, mais inhibés lorsque les mitochondries se dispersent à la périphérie.

S100B, MSBP et retard de la différenciation des CPO.

Dans toutes les lignées cellulaires humaines testées, MSBP1 est exprimée. Il en va de même pour MSBP2, à l'exception de la lignée HS683. L'expression de la S100B n'est pas aussi ubiquitaire. La S100B n'est donc probablement pas indispensable au fonctionnement physiologique de MSBP, mais un régulateur qui intervient dans des conditions particulières. Ainsi dans le lignage oligodendrocytaire, S100B est fortement exprimée de façon transitoire au cours de la maturation (Deloulme et al., 2004; Hachem et al., 2005). L'invalidation de la S100B, ou de sa cible mitochondriale, MSBP, ont des effets similaires : un ralentissement de la différenciation dans les CPO, et un ralentissement du transfert de la PS. Au niveau fonctionnel MSBP apparaît donc bien comme l'effecteur de la S100B dans le contrôle du transfert de la PS et le contrôle de la différenciation des CPO. La maturation des CPO, qui au niveau morphologique se caractérise par un accroissement de la surface membranaire et une synthèse des gaines de myéline, demande un fort taux de synthèse de phospholipides, notamment de PE. La diminution du transfert du précurseur de PE, la PS, du RE vers la mitochondrie lors de l'invalidation de la S100B ou de sa cible, MSBP, pourrait être la cause du retard de différenciation observé.

Néanmoins d'autres hypothèses sont envisageables pour expliquer le retard de différenciation, par exemple la distribution des mitochondries est essentielle dans le contrôle des signalisations calciques intracellulaires.

MSBP marqueur de classification pour distinguer les oligodendrogliomes des glioblastomes?

Des études précédentes avaient déjà montré que les protéines MSBP pouvaient être des marqueurs tumoraux. La recherche d'auto-antigènes extracellulaires chez l'homme lors du développement d'adénocarcinomes du cou et de la nuque (Gires et al., 2004; Schaffrik et al., 2006), ou de leucémies myéloïdes aiguës (Geuijen et al., 2005), avait abouti à l'identification des protéines MSBP. Une localisation subcellulaire anormale, membrane plasmique, a ainsi pu être observée (Geuijen et al., 2005). Ces résultats suggèrent que la perturbation de la fonction MSBP pourrait apparaître lors du développement de tumeurs. Par ailleurs il a été montré chez le rongeur que l'oncogène myc inhibe la transcription de MSBP (Zeller et al., 2003). Nous nous sommes intéressés à l'expression des protéines MSBP dans un contexte

tumoral différent, pas encore étudié, les gliomes, et cela en raison de la localisation chromosomique des gènes MSBP, au locus 1p36, caractérisé par une perte d'hétérozygotie dans les oligodendrogliomes.

Dans ce contexte, la protéine MSBP2 apparaît comme un marqueur qui permet de distinguer les oligodendrogliomes, où elle n'est pas détectée, des glioblastomes. Cependant une des limites de cette approche est que l'expression de MSBP2 dans les glioblastomes reste faible. Les glioblastomes sont des tumeurs très hétérogènes, dans ces tumeurs, la protéine MSBP2 pourrait n'être exprimée que par un type cellulaire particulier, comme celui présentant des propriétés de cellules souches (Ignatova et al., 2002; Loeper et al., 2001).

Perspective

Dans ce contexte développer un anticorps spécifique de MSBP2 pour des marquages sur des coupes de tissus devrait permettre d'utiliser plus aisément MSBP2 pour discriminer les glioblastomes des oligodendrogliomes.

Distinction entre MSBP2 et MSBP1.

Comparé aux autres génomes de mammifères, le génome humain apparaît comme le seul porteur de deux gènes MSBP. En accord avec la duplication récente du gène, MSBP1 et MSBP2 présentent 93 % d'identité, et seule la présence de 62 acides aminés supplémentaires côté C-terminal distingue véritablement la séquence protéique de MSBP2 de celle de MSBP1. Ainsi les deux protéines MSBP1 et MSBP2 sont mitochondriales, capables de former ensemble des hétéro-oligomères, et peuvent interagir toutes deux avec la S100B. La surexpression de l'une ou l'autre des protéines a des effets similaires sur les tests de clonogénéité. Les deux protéines MSBP1 et MSBP2 sont exprimées dans toutes les lignées cellulaires humaines testées au laboratoire : Hela, MCF7, U373, à l'exception de la lignée oligodendrogliale HS683 qui n'exprime que MSBP1. Des analyses de biopsies suggèrent que l'expression de la protéine MSBP2 est ubiquitaire dans l'embryon humain, mais qu'en revanche dans les deux tissus différenciés testés chez l'adulte, cerveau et cœur, la protéine MSBP2 n'est pas détectée, sauf dans une zone germinative de l'hypophyse. D'autre part, en culture dans les cellules U373, une diminution de l'expression de MSBP2 est observée après confluence. Tous ces résultats préliminaires suggèrent que l'expression de la protéine MSBP1 est ubiquitaire, tandis que la protéine MSB2 est exprimée dans les tissus germinatifs et les lignées cellulaires, où MSBP2 pourrait réguler l'activité de MSBP1 via sa capacité à former des hétéro-oligomères avec celle-ci.

LOH et délétion homozygote du gène codant pour MSBP2

La perte d'hétérozygotie au locus 1p36 dans les oligodendrogliomes (Ino et al., 2001; Ino et al., 2000; Jeuken et al., 2001; McDonald et al., 2005; Ohgaki and Kleihues, 2005; Reifenberger et al., 1994; Smith et al., 2005; Smith et al., 2000; Stupp et al., 2006; Watson et al., 2001b), ainsi que dans la lignée HS683 (Branle et al., 2002), avait déjà été montrée. Nous montrons pour la première fois, dans la lignée cellulaire HS683, que le gène codant pour la protéine MSBP2 peut être délété de façon homozygote. Cette délétion homozygote est très localisée, son étendue se restreint au gène Q8N1Z5 et au promoteur et de la partie 5' codante du gène MSBP2. Cette délétion pourrait s'accompagner d'une translocation chromosomique. Ainsi la partie 3' du gène MSBP2, toujours présente, pourrait être fusionnée avec un autre gène. La capacité des protéines MSBP à former des homo- ou hétéro-oligomères, formation d'oligomères qui est nécessaire pour l'activité ATPase (Frickey and Lupas, 2004), suggère que de telles protéines tronquées ou mutées pourraient jouer le rôle de dominant négatif comme nous l'avons par ailleurs observé pour une protéine exogène, la construction MSBP mutée au niveau du motif Walker A.

L'absence d'expression de MSBP2 sauvage dans les oligodendrogliomes pourrait résulter de l'absence d'expression de cette protéine dans les tissus sains d'où dérivent les cellules tumorales. Mais la délétion homozygote du gène MSBP2 dans la lignée HS683, suggère une pression de sélection qui favorise l'invalidation de l'expression de ces gènes au cours du développement tumoral.

Perspectives

Il serait nécessaire d'analyser les causes qui peuvent être à l'origine de l'absence d'expression de MSBP2 dans des biopsies de tumeurs. Mais cela peut s'avérer difficile et complexe. L'absence d'expression de MSBP2 peut avoir des origines multiples : mutation d'un facteur de transcription en amont de l'expression des protéines MSBP, mutation ou méthylation du promoteur, mutation ou troncation de la séquence codante comme nous l'avons déjà montré pour la lignée HS683.

Invalidation des gènes MSBP et transformation cellulaire

Dans les lignées gliales, au contraire de la surexpression de MSBP2, l'invalidation des protéines MSBP favorise la prolifération et la croissance indépendante de l'ancrage.

L'invalidation de la fonction des protéines MSBP pourrait donc participer à la transformation cellulaire lors du développement des oligodendrogliomes. Mais, comparée à l'invalidation de protéines suppresseurs de tumeurs comme p53 ou p21, l'invalidation des protéines MSBP présente des effets nettement moindres. L'invalidation des protéines MSBP ne serait qu'une composante parmi une combinaison complexe de mutations impliquées dans la transformation cellulaire. En accord avec cette observation la LOH au locus 1p36.33 est très étendue et concerne de très nombreux gènes, de nombreux gènes doivent donc être invalidés pour permettre le développement des oligodendrogliomes.

L'invalidation de la protéine mitochondriale MSBP n'inhibe pas l'activité métabolique des mitochondries, au contraire cette invalidation s'accompagne d'une prolifération cellulaire accrue. Cette augmentation de la prolifération peut avoir de multiples origines qui n'ont pas encore été investiguées en détail : raccourcissement de la durée du cycle cellulaire, diminution de la proportion des cellules en G0, diminution de l'apoptose spontanée. Cette dernière hypothèse mériterait une attention particulière. En effet, un renforcement des contacts entre le RE et les mitochondries favorise les transferts de calcium et l'entrée en apoptose (Chami Mounia, 2006; Darios et al., 2005; Filippin et al., 2003; Fransson et al., 2003; Muriel et al., 2000), tandis qu'à l'inverse leur dissociation inhibe l'entrée en apoptose (Simmen et al., 2005). Or nous avons montré dans la lignée U373 que l'invalidation de MSBP s'accompagne d'une diminution des interactions du RE avec les mitochondries.

Perspective

Il serait donc intéressant de tester si la dissociation des interactions entre RE et mitochondries, suite à l'invalidation de MSBP, s'accompagne d'une diminution de l'apoptose spontanée qui expliquerait alors l'augmentation de la prolifération observée.

Importance du type cellulaire dans la transformation tumorale

Chaque type tumoral présente une signature moléculaire qui lui est propre, correspondant à une combinaison d'altérations disparates des séquences ADN : mutations, délétions, méthylations des îlots CpG dans les promoteurs. L'identité tumorale dépend également de l'identité cellulaire des cellules originelles dont elle dérive. Ainsi l'invalidation des gènes MSBP, localisés au locus 1p36.33, accroît la prolifération cellulaire de la lignée gliale U373, mais pas celle de la lignée épithéliale Hela, suggérant que l'invalidation des gènes MSBPs n'a un effet transformant que dans certaines populations cellulaires comme la lignée gliale U373. L'absence d'effet de l'invalidation de MSBP sur la prolifération des cellules Hela comparées

aux cellules U373 peut être corrélée à l'absence d'effet sur la distribution des mitochondries. Contrairement aux cellules U373, dans les cellules Hela les mitochondries sont déjà localisées à la périphérie, l'inactivation de MSBP a donc un effet moindre sur la distribution des cellules.

Conclusion générale

Ce travail a été initié par l'identification d'une protéine, MSBP, comme cible de la calciprotéine S100B dans les cellules progénitrices oligodendrogiales (CPO). Les caractéristiques de cette interaction MSBP-S100B sont classiques et ont déjà été retrouvées pour d'autres cibles de la S100B : interaction dépendante du calcium, régulation de l'oligomérisation de la protéine cible par la S100B. Ces résultats confirment le rôle régulateur que peut jouer le senseur à calcium qu'est la S100B. Par ailleurs cette interaction présente des caractéristiques originales : l'interaction présente une très forte spécificité, mais surtout la cible de la S100B est localisée dans un compartiment subcellulaire particulier : la mitochondrie.

De plus, ce travail ne se réduit pas à l'identification d'une nouvelle cible de la S100B. Aucune étude spécifique préalable ne portait sur cette protéine. La caractérisation fonctionnelle de MSBP, par l'utilisation d'inactivation par siRNA ou par l'utilisation de mutants, a permis de montrer que cette protéine est essentielle dans la régulation de la distribution des mitochondries et de leur interaction avec le RE. Ces résultats démontrent la validité de l'hypothèse du Docteur Vance (Vance et Steenbergen, 2005) selon laquelle la S100B régule la distribution et l'interaction des mitochondries avec le RE, et montrent que pour cela la nouvelle protéine MSBP est l'effecteur de la S100B.

Nous montrons également que la régulation de cette interaction entre mitochondries et RE par MSBP a des conséquences fonctionnelles importantes pour la physiologie de la cellule et de l'organisme. L'inactivation de MSBP induit une réduction du transfert de PS entre le RE et les mitochondries, et un retard de la différenciation des CPO. MSBP apparaît comme le maillon manquant pour expliquer certains phénotypes de la S100B jusqu'alors inexpliqués. L'identification de cette cible explique comment la S100B stimule le transfert de la PS entre RE et mitochondries, résultat qui avait été obtenu par l'équipe du Docteur Kuge (Kuge et al., 2001), et elle explique également comment l'inactivation de la S100B aboutit à un retard de la différenciation des CPO.

Par ailleurs, ce travail ouvre des perspectives sur deux champs d'investigation majeurs. Concernant l'intégration de la fonction de la S100B, la régulation de la distribution des mitochondries pourrait expliquer de nombreux autres phénotypes complexes observés chez les souris invalidées ou transgéniques pour la S100B : perturbation de l'homéostasie calcique,

vieillesse accélérée des neurones, sensibilité accrue aux infarctus, défauts cognitifs. Autant de voies qui restent à explorer.

Cette étude de MSBP permet également d'apporter de nouveaux outils et de nouvelles perspectives dans la distribution subcellulaire des mitochondries. Les études précédentes s'intéressent aux mouvements antérogrades ou rétrogrades des mitochondries. Un mutant comme la construction 1-287, met en évidence l'importance de nouvelles structures comme un centre d'organisation et d'ancrage périnucléaire. Si des questions comme la distribution proximo-distale des mitochondries sont fortement étudiées, la question de l'asymétrie l'est moins. La construction 1-287 devrait permettre d'adresser de nouvelles questions comme la distribution asymétrique des mitochondries lors de la polarisation des cellules, leurs migrations ou leurs divisions asymétriques.

Enfin l'identification d'une nouvelle cible de la S100B et sa caractérisation fonctionnelle ouvrent des perspectives thérapeutiques. Il avait été montré que l'oncogène VerB lorsqu'il est exprimé sous un promoteur S100B induit le développement d'oligodendrogliomes, indiquant que les cellules qui expriment fortement la S100B peuvent être les cellules originelles dont dérivent les oligodendrogliomes. Or la cible de la S100B identifiée par ce travail, est localisée dans le génome humain au locus 1p36.33, caractérisé par une perte d'hétérozygotie dans les oligodendrogliomes. Nous montrons ici que le gène codant pour MSBP2 peut être délété de façon homozygote dans une lignée dérivée d'oligodendrogliome, par ailleurs dans des biopsies de tumeurs, l'absence d'expression de MSBP2 permet de différencier les oligodendrogliomes des glioblastomes. MSBP2 apparaît donc comme un nouveau marqueur pour classer les tumeurs, ce qui permettrait d'adapter leurs traitements. Par ailleurs l'inactivation de MSBP pourrait être une des composantes de la transformation cellulaire à l'origine du développement des oligodendrogliomes. Cette hypothèse mérite d'être approfondie, car MSBP pourrait alors être utilisée comme cible thérapeutique.

Matériel et méthode

Cultures cellulaires

Les lignées cellulaires, U373, U87, HS683, Hela, Cos : les cellules sont cultivées dans du DMEM (Dulbeco Modified Eagle Medium)-Glutamax (Gibco) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (FCS; Seromed) et 1% pénicilline streptomycine dans un incubateur 95% O₂, 5% CO₂ à 37,5°C.

Culture des cellules progénitrices oligodendrogiales de rat (CPO) : les cultures secondaires de CPO ont été obtenues auprès du docteur Labourdette. Les cellules peuvent être congelées dans le milieu suivant : DMEM ½, DCS ½, plus 10% de DMSO. Les cellules sont cultivées dans du DMEM (1/3), F12 (1/3), milieu conditionné B104 (1/3), DCS (Donor Calf Serum) décomplémenté (0.5%), N2 (1%), Glucose 1M (2%), PS (1%). Du PDGF (1/1000) et du bFGF (1/1000) sont rajoutés tous les jours. Un passage cellulaire est effectué tous les 4 à 6 jours, les cellules sont diluées au 1/3. Pour cela les cellules sont décollées mécaniquement à l'aide du flux de la pipette. Pour induire la différenciation un nouveau milieu de culture est utilisé : DMEM (1/2), F12 (1/2), PS (1%), Glucose 1 M (2%), NT3 (1/10000), PDGF (1/1000), Forskolin (1/1000), NTF (1/1000), et l'hormone thyroïdienne T3 (1/750) qui est rajoutée tous les jours.

Courbes de croissance et activité métabolique des cellules

Les siRNA sont transfectés au temps t₀. Au temps t_{24h} les cellules sont trypsinées et ensemencées sur 6 plaques 96 puits à différentes dilutions (6 puits pour chaque condition). A t_{48h} l'activité métabolique des cellules vivantes est mesurée sur une plaque à l'aide du réactif Wst1 (Roche) suivant le protocole du manufacturer. Le réactif WST1 (ROCHE) permet de mesurer sur des cellules vivantes l'activité de la succinate-tétrazolium réductase (Hopper, 1997), une enzyme de la chaîne respiratoire mitochondriale. Puis, après un lavage au PBS, la même plaque est colorée au cristal violet : 50 µl d'une solution de cristal violet (0.05% de cristal dans 25% méthanol, 75% H₂O) sont ajoutés par puits et incubés pendant 15 min. Les excès de colorant sont retirés par quatre lavages successifs par immersion dans de l'eau. Les plaques sont séchées 12h à RT. Le colorant est dissout par une solution de sodium citrate (50% éthanol). La lecture de l'absorbance s'effectue à 540 nm. Le cristal violet colore les protéines, et l'absorbance est proportionnelle au nombre de cellules par unité de surface. La même opération est répétée toutes les 24h. Les différentes dilutions présentes à un temps t sur

une même plaque permettent de rapporter l'activité métabolique (Wst1) au nombre de cellules (cristal violet). Et le suivi au cours du temps du nombre de cellules (cristal violet) pour une même dilution permet d'obtenir une courbe de croissance. Chaque valeur est une moyenne sur 6 puits, et l'expérience a été répétée trois fois.

Transfections

Les transfections des siRNA et des cDNA dans les lignées cellulaires sont réalisées avec la Lipofectamine 2000 (Invitrogen), suivant le protocole du fabricant. Lors des transfections de siRNA un mélange équimolaire des 3 siRNA suivants est utilisé :

SiRNA n°1 : 5'gCAgCAgCAACUUCUCAAU(dTdT)3'

SiRNA n°2 : 5'gCAACAgUCCAAgCUCAAA(dTdT)3'

SiRNA n°3 : 5'gAAgUUgCUCCAUUUgUCC(dTdT)3'

Les CPO ont été transfectées à l'aide du kit Amaxa Rat oligodendrocyte Nucleofector™ suivant le protocole du fabricant. Pour inhiber MSBP le siRNA n°3 est utilisé.

Préparation de l'extrait de mitochondries brutes

Des cellules cultivées à 90% de confluence dans des boîtes de 10ml sont lysées dans le tampon suivant : 0,28 M sucrose ; Tris 10 mM pH 7.4 ; 0.5 mM EDTA ou 0.3 mM CaCl₂. Les cellules sont brisées de façon mécanique par le passage répété dans une seringue (22g) pendant 10 minutes à 4° C. La suspension est centrifugée à 1200 g pendant 5 minutes pour éliminer les noyaux et les cellules non lysées dans le culot (N). Le surnageant est centrifugé à 11000 g pendant 10 minutes. Le culot contient les mitochondries (M), le surnageant contient le cytosol et les membranes plasmiques (C).

Digestion tryptique des mitochondries brutes

Des mitochondries brutes (140 µg de protéines) sont incubées dans 200 µl de PBS avec 2.5 µg de trypsine à 37°C pour des durées variables. La digestion est stoppée par l'addition de 20 µl d'un tampon Laemli complété par du pfabloc. 5µl de chaque échantillon sont séparés par SDS-PAGE et analysés par Western Blot.

Extractions différentielles

Des mitochondries brutes (140 µg de protéines) sont incubées à 4°C dans différents tampons : à fortes concentrations de sel (NaCl, 1M), à pH basique (Na₂CO₃, pH 11,5), ou contrôle (40 mM Tris pH 7.4, 150mM NaCl). Les mitochondries sont resuspendues pendant 10 min à la pipette, puis centrifugées à 11000 g pendant 10 minutes. Le culot et le surnageant sont séparés par SDS-PAGE et analysés par Western Blot.

Fractions submitochondriales

Des mitochondries brutes sont suspendues dans 1.45 ml d'un tampon hypotonique : 10 mM Hepes/KOH ; pH 7.4 ; 0.5 mM EDTA. Après 30 minutes d'incubation sur la glace, 0.55 ml de sucrose 55% (poids/volume) sont ajoutés, et les mitochondries incubées 15 minutes supplémentaires sur la glace. Après sonnication (4x1 min), les mitochondries intactes sont éliminées par une centrifugation (15,000 x g, 10 min(14,000 rpm)). Le surnageant est centrifugé à 200,000 x g (55,000 rpm) à 4°C pendant 60 min. Le culot est suspendu dans 60 µl de tampon (10 mM Hepes/KOH, pH 7.4, 10 mM KCl). Après une centrifugation de clarification (15,000 x g, 10 min (14,000 rpm)), le surnageant est déposé sur un gradient discontinu de sucrose constitué de 280 µl 55%, 1020 µl 46%, 460 µl 38%, 280 µl 29 % (poids/volume) sucrose dans 10 mM Hepes/KOH ; pH 7.4 ; 10 mM KCl. Après centrifugation (100,000g, 6h, 4°C), des fractions de 140 µl sont collectées du fond du tube vers la surface.

Crosslinking sur mitochondries

12 boîtes de cellules U373 sont lysées dans 20 ml de tampon Hepes 20 mM pH 7.4, sucrose 0.28 M. Les cellules sont brisées mécaniquement par 20 passages dans une seringue, puis centrifugées à 3000 g. Le surnageant est ensuite centrifugé à 17000 g, le culot (mitochondries) est repris dans 600 µl de tampon Hepes 20 mM pH 7.4, sucrose 0.28 M. Des aliquots de 150 µl sont produits et peuvent être supplémentés par : 0.4 mM CaCl₂, 20 µM ZnCl₂, 16 µM S100B et incubés 20 min. Sont ensuite ajoutés 1.5 µl de crosslinker BS3 à 25 mM et incubés pendant des temps variables. Pour l'analyse 10 µl sont déposés sur gel SDS-PAGE.

Interactions avec les billes S100B-sepharose

Les protéines S100 et CaM recombinantes sont produites et purifiées comme décrit précédemment (Deloulme, 2000). Les billes S100B-sépharose sont préparées par la réaction de la S100B recombinante avec des billes CnBr-sépharose dans 20 mM Hepes pH 7,8 ;

0,5mM CaCl₂. La réaction est stoppée par l'ajout d'un tampon Tris : 40 mM Tris pH 7,4 ; 150mM NaCl ; 0,3 % triton X100. Les billes contiennent 2 mg de protéines par ml.

L'extrait de protéines à tester est incubé à 4°C pendant 10 min sous agitation dans 1,5 ml de tampon d'interaction 40 mM Tris pH 7,4; 150 mM NaCl ; 10 µM ZnSO₄ ; 0,3 mM CaCl₂ ; 0,3 % triton X100, avec 40 µl de billes S100B-Sépharose préalablement équilibrées. Puis, les billes sont centrifugées et le surnageant éliminé. Les billes sont lavées deux fois, transférées dans un nouveau tube lors du dernier lavage, et bouillies dans 50 µl de tampon SDS. Dans le cas d'une interaction de la protéine MSBP radiomarquée avec les billes de S100B-sépharose, 15 µl de lysat de réticulocyte contenant une production de MSBP marquée au ³⁵S, sont ajoutés au tampon d'interaction à 4°C pendant 10 min. Une protéine recombinant peut être ajoutée à des concentrations variables comme compétiteur.

PCR génomique

Des cellules cultivées à 90 % de confluence dans des boîtes de 10 cm sont lysées dans 500µl (300 mM acétate de sodium, Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, SDS 1%), puis la protéinase K est ajoutée à 0,2 µg/µl, et le tout est incubé sous agitation à 37°C sur la nuit. Puis, 500 µl de phénol chloroforme est ajouté, le tube vigoureusement agité, centrifugé à 15000 g pendant 5 min, la phase aqueuse prélevée pour un génotypage par PCR. Pour la PCR les amorces suivantes sont utilisées :

FgenoNM_022834 CTGGACAGGAAGAGGGAGATGTCTG ;

RgenoNM_022834 AAGGTGTCGGAGGCACAGCAATGAC

5'genoFQ96A50 CGGAGGACAGCGGATGTTGGTGACT

5'genoRQ96A50 TGAGGCCAGGAAGGAGGGAAGGGAT

3'genoRQ96A50 CCAGCACTTTGGGAGGACAAAGGGG

3'genoFQ96A50 AGGCCGAGATGGGCGGATCATGAAG

3'genoFQ9BUK4 CCTGACTTCGTGATCTGCCCCGCTTC

3'genoRQ9BUK4 GCCCACAGGTGACATACTCAGTGG

PgenoFQ9BUK4 GATGTGAACTGTCAGTCCTCTGAGC

PgenoRQ9BUK4 CCGACTCTCTCCTTGATAGGAATGG

5'2genoFQ9BUK4 CACCGTGTTAGCCAGGATGGTCTCG

5'2genoRQ9BUK4 ACCACCCTGGCCAAGGTGGTCAAAC

FgenoQ8N852 TGGGACTCGGTGGTTGTGGGCTGAT

RgenoQ8N852 GGACACAGCTGCAGAGCTGATTCCC

FQ8N1Z5 GTCATGCCGGAAGATCGCACAGCTG

RQ8N1Z5 TGACCTGTGACCGTCAGCCACTGAC

Les températures respectives d'hybridation pour chaque couple d'amorces sont : 67, 71, 71, 67, 67, 67, 71 °C. 300 ng de matrice sont utilisés pour 40 µl de réaction, 45 cycles sont effectués, la température d'élongation est de 72°C, la température de dénaturation 98°C

Production de S100B ou NSBP en lysat de réticulocytes

50 µl de lysat de réticulocytes de lapin (TNT quick; Promega), système de transcription traduction eucaryote in vitro, est complété par 0,5 µl de plasmide à 1 mg/ml (comportant le gène d'intérêt sous promoteur T7), 2 µl du mélange (³⁵S) méthionine/(³⁵S) cystéine, puis est incubé 1h à 37°C.

Bleu de Coomassie, Western Blot, Far Western

Les protéines sont migrées dans un gel polyacrylamide SDS-Tris-Glycine. Soit le gel est coloré au bleu de Coomassie, soit les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose.

Western Blot : la membrane de nitrocellulose est saturée pendant 30 minutes dans du TBS complété par 5% de lait, lavée dans du TTBS (TBS 0.2 % Tween), incubée pendant deux heures avec les anticorps primaires dans du TTBS complété par 1% de lait, lavée dans du TTBS trois fois 10 minutes ; incubée pendant 45 minutes avec les anticorps secondaires dans du TTBS complété par 1% de lait, lavée 4 fois 10 minutes. La révélation est effectuée à l'aide du réactif Western lightening (Perkin Elmer).

Far Western : la membrane de nitrocellulose est saturée une heure dans 50 ml de tampon de saturation 25 mM Hepes-KOH pH 7,7 ; 25 mM NaCl ; BSA 3% ; DTT 20 mM ; NP40 0,05 %. Puis la membrane est mise à hybrider sur la nuit dans un tampon d'hybridation 20 mM Hepes KOH pH 7,7 ; 75 mM KCl ; BSA 0,1% ; DTT 20 mM ; NP40 500 µl de 0,05 %, complété par 50 µl d'une production de S100B radiomarquée au ³⁵S en lysat de réticulocytes. Les tampons d'hybridation et de saturation peuvent être supplémentés à 10 µM ZnSO₄, 2mM MgCl₂, 0,3mM CaCl₂, 2mM EDTA, 2mM EGTA final. Les membranes sont ensuite isolées sous film plastique puis exposées sur la nuit pour autoradiographie.

Test de Soft Agar

Dans des puits de 35 mm de diamètre, 10^4 cellules sont suspendues dans 2 ml d'agar 0.35% (poids/volume) dilué dans du DMEM complété à 20% FCS (Fœtal Calf Serum) et déposé au dessus d'une couche d'agar 0.5% dilué dans du DMEM complété à 20% FCS. Les expériences sont faites en double, et les cellules cultivées pendant 8 jours.

Test de clonogénéicité

Après transfection des cellules à t0, à t48h les cellules sont ensemencées à différentes dilutions, et soumises à une sélection G418 625µg/ml (Gibco –BRL). Après 12 jours les cellules sont fixées et colorées au cristal violet. Le nombre et la taille des clones sont analysés.

Coimmunoprécipitation

Les cellules sont cultivées à 80% de confluence dans trois boîtes de 10 cm, sont lavées dans du PBS, et lysées dans 4.5 ml du tampon 40 mM Tris pH 7.4 ; 150 mM NaCl ; 0.3% Triton X100. Après une centrifugation à 17000 g, 1.5 ml du surnageant sont incubés sous agitation douce 1h à 4°C avec 10 µg d'anticorps monoclonal S16 anti S100B et des protéines G-sépharose. Les protéines immunoprécipitées sont lavées trois fois, séparées par un gel SDS-PAGE, et révélées par Western Blot (WB).

Immunofluorescence

Les cellules sont incubées avec 500 nM de MitoTracker pendant 45 min à 37°C.

Les cellules sont lavées dans du PBS (Phosphate Buffer Saline) et fixées dans du méthanol à -20°C pendant 10 min, ou dans du PFA (ParaFormaldéhyde) à 37°C pendant 10 min. Les cellules fixées au PFA sont perméabilisées soit avec 0.3 % Triton X100 dans du TBS à RT, soit à 4°C, 10 min, avec de l'acétone préalablement refroidi à 20°C. Après lavage les cellules sont incubées 1h à RT dans du TBS complété par 10 % de sérum de chèvre, puis 2 heures avec l'anticorps primaire dans du TBS, lavées trois fois, incubées 45 min avec l'anticorps secondaire, lavées trois fois dix minutes et montées dans une solution de montage (Dako).

Anticorps :

Les anticorps N-ter et C-ter dirigés contre MSBP ont été obtenus par une immunisation de lapins à l'aide des peptides CLKAEGPGRGDESPS et RPAPKDKWSNFDPTGC. Cytochrome C (Calbiochem PC323) ; ATP Synthase, Anticorps monoclonal de souris, B

(Abcam ab5432-100) ; F1 ATP synthase, polyclonal de lapin, a été fourni par le Dr Gérard Brandolin (1/3000 en WB) ; ANT1, polyclonal de lapin (1/1000 en WB) ; GMI130 (BD Transduction Laboratory 610822) ; IP3R-3 (BD Transduction Laboratories 610312)

Clonages

Les cDNA des gènes MSBP1 et MSBP2 clonés dans le vecteur pOTB7 nous ont été fournis par le consortium I.M.A.G.E. Les inserts ont été sous-clonés dans le vecteur pcDNA3.1(+) (Invitrogen) à l'aide des sites de restriction EcoRI et XhoI (Enzymes de restriction Fermentas).

Les constructions 1-280 et 1-320 ont été amplifiées par PCR, sous-clonées dans le vecteur pGEM-Teasy (Promega), et clonées dans le vecteur pcDNA3.1 (Invitrogen) à l'aide des sites de restriction EcoRI et BamHI. Les amorces suivantes ont été utilisées pour l'amplification de l'insert :

Construction 1-287 :

FQ96A50 blunt : CGGCGGTGCGAGCATGTCGTGG

RQ96A50_1-287 : GGATCCCCCTCACTAGGGACGGCT

Construction 1-320:

FQ96A50 blunt : CGGCGGTGCGAGCATGTCGTGG

RQ96A50_1-320: GGATCCTGGGACTGAGCACAAC

Les constructions MSBP1-myc, MSBP2-myc et 392-myc ont été amplifiées par PCR, sous clonées dans le vecteur pGEM-Teasy (Promega), et clonées dans le vecteur pcDNA3.1/Myc-HisA (Invitrogen) à l'aide des sites de restriction EcoRI et HindIII. Les amorces suivantes ont été utilisées pour l'amplification de l'insert :

Construction MSBP1-myc:

FQ96A50 blunt : CGGCGGTGCGAGCATGTCGTGG

RQ96A50myc:CCTCGAGAACTCAATCCTCTTC

Construction MSBP2-myc:

FQ96A50 blunt : CGGCGGTGCGAGCATGTCGTGG

RQ96A50myc : AAAGCTTGGCAACAGGGGGTGCCC

Construction 392-myc:

FQ96A50 blunt : CGGCGGTGCGAGCATGTCGTGG

FQ96A50\392-586 : GCCACCATGCACAAGCTCTT

La construction 54-586myc a été obtenue à partir de la construction sauvage 1-586 clonée dans le vecteur pcDNA3.1/Myc-HisA, par une simple digestion des sites de restriction BstXI internes à la séquence codante et dans la partie 5' du polylinker, purification et ligation du produit.

Pour la construction WA, la lysine localisée dans le site de fixation des nucléotides Walker A, en position 358, a été remplacée par un glutamate, pour cela les deux jeux d'amorces suivants ont été utilisés séparément:

Amplification A :

FwalkerA :CCAGGCACCGGGGAGACGCTGTTTG

RQ96A50 blunt :CCGATCCAGGATGGGGAGGGCTCGTCCC

Amplification B :

RwalkerA :CAAACAGCGTCTcCCCGGTGCCTGG

FQ96A50 blunt : CGGCGGTGCGAGCATGTCGTGG

Puis lors d'une deuxième étape, les produits des amplifications A et B ont été purifiés, mélangés et une deuxième amplification a été réalisée avec les amorces suivantes :

RQ96A50 blunt :CCGATCCAGGATGGGGAGGGCTCGTCCC

FQ96A50 blunt : CGGCGGTGCGAGCATGTCGTGG

Les constructions 1-193, 1-216, 1-231, 1-251, 1-272 ont été clonées dans le vecteur pGEM-Teasy (Promega), et leur orientation contrôlée à l'aide de l'enzyme de restriction PstI. Pour les amplifications PCR les amorces suivantes ont été utilisées :

Construction 1-251 :

FQ96A50 blunt : CGGCGGTGCGAGCATGTCGTGG

RQ96A50_1-251 :AGCGGCCGCTTACGTGGCTGTCACTTTGTC

Construction 1-231 :

FQ96A50 blunt : CGGCGGTGCGAGCATGTCGTGG

Q96A50_1-231 :AGCGGCCGCTTAGCCAGCCGTCCTGATGGA

Construction 1-216 :

FQ96A50 blunt : CGGCGGTGCGAGCATGTCGTGG

Q96A50_1-216 :AGCGGCCGCTTACGCCTTCAGGCGGATCTG

Construction 1-193 :

FQ96A50 blunt : CGGCGGTGCGAGCATGTCGTGG

RQ96A50 1-193 :CGCCGGGCCTCGGCCTCCACTCG

Bibliographie

- Achleitner, G., Gaigg, B., Krasser, A., Kainersdorfer, E., Kohlwein, S. D., Perktold, A., Zellnig, G. and Daum, G.** (1999). Association between the endoplasmic reticulum and mitochondria of yeast facilitates interorganelle transport of phospholipids through membrane contact. *Eur J Biochem* **264**, 545-53.
- Achleitner, G., Zweytick, D., Trotter, P. J., Voelker, D. R. and Daum, G.** (1995). Synthesis and intracellular transport of aminoglycerophospholipids in permeabilized cells of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **270**, 29836-42.
- Adami, C., Bianchi, R., Pula, G. and Donato, R.** (2004). S100B-stimulated NO production by BV-2 microglia is independent of RAGE transducing activity but dependent on RAGE extracellular domain. *Biochim Biophys Acta* **1742**, 169-77.
- Alexander, C., Votruba, M., Pesch, U. E., Thiselton, D. L., Mayer, S., Moore, A., Rodriguez, M., Kellner, U., Leo-Kottler, B., Auburger, G. et al.** (2000). OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet* **26**, 211-5.
- Allore, R. J., Friend, W. C., O'Hanlon, D., Neilson, K. M., Baumal, R., Dunn, R. J. and Marks, A.** (1990). Cloning and expression of the human S100 beta gene. *J Biol Chem* **265**, 15537-43.
- Ammelburg, M., Frickey, T. and Lupas, A. N.** (2006). Classification of AAA+ proteins. *J Struct Biol.*
- Andersson, S. G., Zomorodipour, A., Andersson, J. O., Sicheritz-Ponten, T., Alsmark, U. C., Podowski, R. M., Naslund, A. K., Eriksson, A. S., Winkler, H. H. and Kurland, C. G.** (1998). The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* **396**, 133-40.
- Arcuri, C., Bianchi, R., Brozzi, F. and Donato, R.** (2005). S100B increases proliferation in PC12 neuronal cells and reduces their responsiveness to nerve growth factor via Akt activation. *J Biol Chem* **280**, 4402-14.
- Arcuri, C., Giambanco, I., Bianchi, R. and Donato, R.** (2002). Annexin V, annexin VI, S100A1 and S100B in developing and adult avian skeletal muscles. *Neuroscience* **109**, 371-88.
- Ardail, D., Gasnier, F., Lerme, F., Simonot, C., Louisot, P. and Gateau-Roesch, O.** (1993). Involvement of mitochondrial contact sites in the subcellular compartmentalization of phospholipid biosynthetic enzymes. *J Biol Chem* **268**, 25985-92.
- Ardail, D., Lerme, F. and Louisot, P.** (1991). Involvement of contact sites in phosphatidylserine import into liver mitochondria. *J Biol Chem* **266**, 7978-81.
- Arnesano, F., Banci, L., Bertini, I., Fantoni, A., Tenori, L. and Viezzoli, M. S.** (2005). Structural interplay between calcium(II) and copper(II) binding to S100A13 protein. *Angew Chem Int Ed Engl* **44**, 6341-4.
- Arumugam, T., Simeone, D. M., Schmidt, A. M. and Logsdon, C. D.** (2004). S100P stimulates cell proliferation and survival via receptor for activated glycation end products (RAGE). *J Biol Chem* **279**, 5059-65.
- Ashby, L. S. and Shapiro, W. R.** (2004). Low-grade glioma: supratentorial astrocytoma, oligodendroglioma, and oligoastrocytoma in adults. *Curr Neurol Neurosci Rep* **4**, 211-7.
- Aw, T. Y. and Jones, D. P.** (1989). Nutrient supply and mitochondrial function. *Annu Rev Nutr* **9**, 229-51.
- Baas, P. W., Karabay, A. and Qiang, L.** (2005). Microtubules cut and run. *Trends Cell Biol* **15**, 518-24.
- Babcock, D. F., Herrington, J., Goodwin, P. C., Park, Y. B. and Hille, B.** (1997). Mitochondrial participation in the intracellular Ca²⁺ network. *J Cell Biol* **136**, 833-44.
- Bachoo, R. M., Maher, E. A., Ligon, K. L., Sharpless, N. E., Chan, S. S., You, M. J., Tang, Y., DeFrances, J., Stover, E., Weissleder, R. et al.** (2002). Epidermal growth factor receptor and Ink4a/Arf: convergent mechanisms governing terminal differentiation and transformation along the neural stem cell to astrocyte axis. *Cancer Cell* **1**, 269-77.
- Ball, E. H. and Singer, S. J.** (1982). Mitochondria are associated with microtubules and not with intermediate filaments in cultured fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 123-6.
- Banfalvi, T., Udvarhelyi, N., Orosz, Z., Gergye, M., Gilde, K. and Timar, J.** (2003). Heterogenous S-100B protein expression patterns in malignant melanoma and association with serum protein levels. *Oncology* **64**, 374-9.
- Barber, K. R., McClintock, K. A., Jamieson, G. A., Jr., Dimlich, R. V. and Shaw, G. S.** (1999). Specificity and Zn²⁺ enhancement of the S100B binding epitope TRTK-12. *J Biol Chem* **274**, 1502-8.
- Barger, S. W. and Van Eldik, L. J.** (1992). S100 beta stimulates calcium fluxes in glial and neuronal cells. *J Biol Chem* **267**, 9689-94.
- Barnett, D. K., Kimura, J. and Bavister, B. D.** (1996). Translocation of active mitochondria during hamster preimplantation embryo development studied by confocal laser scanning microscopy. *Dev Dyn* **205**, 64-72.

Barni, S., Sciola, L., Spano, A. and Pippia, P. (1996). Static cytofluorometry and fluorescence morphology of mitochondria and DNA in proliferating fibroblasts. *Biotech Histochem* **71**, 66-70.

Baron, K. T., Wang, G. J., Padua, R. A., Campbell, C. and Thayer, S. A. (2003). NMDA-evoked consumption and recovery of mitochondrially targeted aequorin suggests increased Ca²⁺ uptake by a subset of mitochondria in hippocampal neurons. *Brain Res* **993**, 124-32.

Baudier, J., Bronner, C., Kligman, D. and Cole, R. D. (1989). Protein kinase C substrates from bovine brain. Purification and characterization of neuromodulin, a neuron-specific calmodulin-binding protein. *J Biol Chem* **264**, 1824-8.

Baudier, J. and Cole, R. D. (1988). Interactions between the microtubule-associated tau proteins and S100b regulate tau phosphorylation by the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* **263**, 5876-83.

Baudier, J. and Cole, R. D. (1989). The Ca²⁺-binding sequence in bovine brain S100b protein beta-subunit. A spectroscopic study. *Biochem J* **264**, 79-85.

Baudier, J., Delphin, C., Grunwald, D., Khochbin, S. and Lawrence, J. J. (1992). Characterization of the tumor suppressor protein p53 as a protein kinase C substrate and a S100b-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 11627-31.

Baudier, J. and Gerard, D. (1986). Ions binding to S100 proteins. II. Conformational studies and calcium-induced conformational changes in S100 alpha alpha protein: the effect of acidic pH and calcium incubation on subunit exchange in S100a (alpha beta) protein. *J Biol Chem* **261**, 8204-12.

Baudier, J., Glasser, N. and Duportail, G. (1986). Bimane- and acrylodan-labeled S100 proteins. Role of cysteines-85 alpha and -84 beta in the conformation and calcium binding properties of S100 alpha alpha and S100b (beta beta) proteins. *Biochemistry* **25**, 6934-41.

Baudier, J., Lee, S. H. and Cole, R. D. (1987). Separation of the different microtubule-associated tau protein species from bovine brain and their mode II phosphorylation by Ca²⁺/phospholipid-dependent protein kinase C. *J Biol Chem* **262**, 17584-90.

Bavister, B. D. and Squirrel, J. M. (2000). Mitochondrial distribution and function in oocytes and early embryos. *Hum Reprod* **15 Suppl 2**, 189-98.

Benowitz, L. I. and Routtenberg, A. (1997). GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci* **20**, 84-91.

Bereiter-Hahn, J. (1990). Behavior of mitochondria in the living cell. *Int Rev Cytol* **122**, 1-63.

Bernardi, P., Colonna, R., Costantini, P., Eriksson, O., Fontaine, E., Ichas, F., Massari, S., Nicoli, A., Petronilli, V. and Scorrano, L. (1998). The mitochondrial permeability transition. *Biofactors* **8**, 273-81.

Berridge, M. J. (2002). The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium* **32**, 235-49.

Beutner, G., Ruck, A., Riede, B., Welte, W. and Brdiczka, D. (1996). Complexes between kinases, mitochondrial porin and adenylate translocator in rat brain resemble the permeability transition pore. *FEBS Lett* **396**, 189-95.

Bhakoo, K. K., Williams, S. R., Florian, C. L., Land, H. and Noble, M. D. (1996). Immortalization and transformation are associated with specific alterations in choline metabolism. *Cancer Res* **56**, 4630-5.

Bhattacharya, S., Bunick, C. G. and Chazin, W. J. (2004). Target selectivity in EF-hand calcium binding proteins. *Biochim Biophys Acta* **1742**, 69-79.

Bhattacharya, S., Large, E., Heizmann, C. W., Hemmings, B. and Chazin, W. J. (2003). Structure of the Ca²⁺/S100B/NDR kinase peptide complex: insights into S100 target specificity and activation of the kinase. *Biochemistry* **42**, 14416-26.

Bianchi, R., Garbuglia, M., Verzini, M., Giambanco, I., Ivanenkov, V. V., Dimlich, R. V., Jamieson, G. A., Jr. and Donato, R. (1996). S-100 (alpha and beta) binding peptide (TRTK-12) blocks S-100/GFAP interaction: identification of a putative S-100 target epitope within the head domain of GFAP. *Biochim Biophys Acta* **1313**, 258-67.

Bianchi, R., Giambanco, I. and Donato, R. (1993). S-100 protein, but not calmodulin, binds to the glial fibrillary acidic protein and inhibits its polymerization in a Ca(2+)-dependent manner. *J Biol Chem* **268**, 12669-74.

Bianchi, R., Verzini, M., Garbuglia, M., Giambanco, I. and Donato, R. (1994). Mechanism of S100 protein-dependent inhibition of glial fibrillary acidic protein (GFAP) polymerization. *Biochim Biophys Acta* **1223**, 354-60.

Bindokas, V. P., Lee, C. C., Colmers, W. F. and Miller, R. J. (1998). Changes in mitochondrial function resulting from synaptic activity in the rat hippocampal slice. *J Neurosci* **18**, 4570-87.

Bjerve, K. S. (1985). The biosynthesis of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine from L-[3-¹⁴C]serine in isolated rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* **833**, 396-405.

Bjor, M., Zhukov, I., Zhukova, L., Pozanski, J., Wszelaka-Rylik, M. and Wyslouch-Cieszynska, A. (2006). Impact of S-Nitrosylation on cation binding and conformation of S100A1 and S100B proteins. In *9th meeting of the European Calcium Society*.

Bleazard, W., McCaffery, J. M., King, E. J., Bale, S., Mozdy, A., Tieu, Q., Nunnari, J. and Shaw, J. M. (1999). The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nat Cell Biol* **1**, 298-304.

Bogan, N. and Cabot, J. B. (1991). Light and electron microscopic analyses of intraspinal axon collaterals of sympathetic preganglionic neurons. *Brain Res* **541**, 241-51.

Boitier, E., Rea, R. and Duchen, M. R. (1999). Mitochondria exert a negative feedback on the propagation of intracellular Ca²⁺ waves in rat cortical astrocytes. *J Cell Biol* **145**, 795-808.

Bonfrer, J. M. and Korse, C. M. (2001). Monitoring malignant melanoma with the S-100B tumour marker. *Recent Results Cancer Res* **158**, 149-57.

Boni, R., Heizmann, C. W., Doguoglu, A., Ilg, E. C., Schafer, B. W., Dummer, R. and Burg, G. (1997). Ca(2+)-binding proteins S100A6 and S100B in primary cutaneous melanoma. *J Cutan Pathol* **24**, 76-80.

Bouvier, C., Bartoli, C., Aguirre-Cruz, L., Virard, I., Colin, C., Fernandez, C., Gouvernet, J. and Figarella-Branger, D. (2003). Shared oligodendrocyte lineage gene expression in gliomas and oligodendrocyte progenitor cells. *J Neurosurg* **99**, 344-50.

Bowman, A. B., Patel-King, R. S., Benashski, S. E., McCaffery, J. M., Goldstein, L. S. and King, S. M. (1999). Drosophila roadblock and Chlamydomonas LC7: a conserved family of dynein-associated proteins involved in axonal transport, flagellar motility, and mitosis. *J Cell Biol* **146**, 165-80.

Brandes, R. and Bers, D. M. (1997). Intracellular Ca²⁺ increases the mitochondrial NADH concentration during elevated work in intact cardiac muscle. *Circ Res* **80**, 82-7.

Branle, F., Lefranc, F., Camby, I., Jeuken, J., Geurts-Moespot, A., Sprenger, S., Sweep, F., Kiss, R. and Salmon, I. (2002). Evaluation of the efficiency of chemotherapy in in vivo orthotopic models of human glioma cells with and without 1p19q deletions and in C6 rat orthotopic allografts serving for the evaluation of surgery combined with chemotherapy. *Cancer* **95**, 641-55.

Breckenridge, D. G., Stojanovic, M., Marcellus, R. C. and Shore, G. C. (2003). Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol. *J Cell Biol* **160**, 1115-27.

Brini, M., De Giorgi, F., Murgia, M., Marsault, R., Massimino, M. L., Cantini, M., Rizzuto, R. and Pozzan, T. (1997). Subcellular analysis of Ca²⁺ homeostasis in primary cultures of skeletal muscle myotubes. *Mol Biol Cell* **8**, 129-43.

Bristow, E. A., Griffiths, P. G., Andrews, R. M., Johnson, M. A. and Turnbull, D. M. (2002). The distribution of mitochondrial activity in relation to optic nerve structure. *Arch Ophthalmol* **120**, 791-6.

Brodersen, D. E., Etzerodt, M., Madsen, P., Celis, J. E., Thogersen, H. C., Nyborg, J. and Kjeldgaard, M. (1998). EF-hands at atomic resolution: the structure of human psoriasis (S100A7) solved by MAD phasing. *Structure* **6**, 477-89.

Brodersen, D. E., Nyborg, J. and Kjeldgaard, M. (1999). Zinc-binding site of an S100 protein revealed. Two crystal structures of Ca²⁺-bound human psoriasis (S100A7) in the Zn²⁺-loaded and Zn²⁺-free states. *Biochemistry* **38**, 1695-704.

Brodin, L., Bakeeva, L. and Shupliakov, O. (1999). Presynaptic mitochondria and the temporal pattern of neurotransmitter release. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **354**, 365-72.

Brownlees, J., Ackerley, S., Grierson, A. J., Jacobsen, N. J., Shea, K., Anderton, B. H., Leigh, P. N., Shaw, C. E. and Miller, C. C. (2002). Charcot-Marie-Tooth disease neurofilament mutations disrupt neurofilament assembly and axonal transport. *Hum Mol Genet* **11**, 2837-44.

Brozzi F., A. C., Donato R. (2006). Inhibition of S100B expression in astrocytes results in reduced proliferation and stellation: implication for astrocyte activation. In *9th meeting of the european calcium society*.

Bruce, J. I., Giovannucci, D. R., Blinder, G., Shuttleworth, T. J. and Yule, D. I. (2004). Modulation of [Ca²⁺]_i signaling dynamics and metabolism by perinuclear mitochondria in mouse parotid acinar cells. *J Biol Chem* **279**, 12909-17.

Bucheler, K., Adams, V. and Brdiczka, D. (1991). Localization of the ATP/ADP translocator in the inner membrane and regulation of contact sites between mitochondrial envelope membranes by ADP. A study on freeze-fractured isolated liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1056**, 233-42.

Businaro, R., Leone, S., Fabrizi, C., Sorci, G., Donato, R., Lauro, G. M. and Fumagalli, L. (2006). S100B protects LAN-5 neuroblastoma cells against Abeta amyloid-induced neurotoxicity via RAGE engagement at low doses but increases Abeta amyloid neurotoxicity at high doses. *J Neurosci Res* **83**, 897-906.

Cairncross, J. G. and Macdonald, D. R. (1988). Successful chemotherapy for recurrent malignant oligodendroglioma. *Ann Neurol* **23**, 360-4.

Cairncross, J. G., Ueki, K., Zlatescu, M. C., Lisle, D. K., Finkelstein, D. M., Hammond, R. R., Silver, J. S., Stark, P. C., Macdonald, D. R., Ino, Y. et al. (1998). Specific genetic predictors of

chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst* **90**, 1473-9.

Capetanaki, Y. (2002). Desmin cytoskeleton: a potential regulator of muscle mitochondrial behavior and function. *Trends Cardiovasc Med* **12**, 339-48.

Carpentier, A. F. (2005). Neuro-oncology: the growing role of chemotherapy in glioma. *Lancet Neurol* **4**, 4-5.

Carroll, E. W. and Wong-Riley, M. T. (1984). Quantitative light and electron microscopic analysis of cytochrome oxidase-rich zones in the striate cortex of the squirrel monkey. *J Comp Neurol* **222**, 1-17.

Chada, S. R. and Hollenbeck, P. J. (2003). Mitochondrial movement and positioning in axons: the role of growth factor signaling. *J Exp Biol* **206**, 1985-92.

Chada, S. R. and Hollenbeck, P. J. (2004). Nerve growth factor signaling regulates motility and docking of axonal mitochondria. *Curr Biol* **14**, 1272-6.

Chami Mounia, O. B., Tacine Rachidan Szabadkai György, Durieux Christiane, Rosario Rizzuto et Paterlini-Bréchot Patrizia. (2006). SERCA1 truncated isoform (S1T) expression modifies ER/Mitochondria calcium signaling cross talk and is involved in ER Stress-induced apoptosis. In *9th meeting of the european calcium society, Strasbourg 19-22 july 2006*.

Chang, D. T., Honick, A. S. and Reynolds, I. J. (2006). Mitochondrial trafficking to synapses in cultured primary cortical neurons. *J Neurosci* **26**, 7035-45.

Chen, H., Chomyn, A. and Chan, D. C. (2005). Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem* **280**, 26185-92.

Chen, H., Detmer, S. A., Ewald, A. J., Griffin, E. E., Fraser, S. E. and Chan, D. C. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* **160**, 189-200.

Cheung, W. Y. (1970). Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase. Demonstration of an activator. *Biochem Biophys Res Commun* **38**, 533-8.

Chouaf, L., Didier-Bazes, M., Hardin, H., Aguera, M., Fevre-Montange, M., Voutsinos, B. and Belin, M. F. (1991). Developmental expression of glial markers in ependymocytes of the rat subcommissural organ: role of the environment. *Cell Tissue Res* **266**, 553-61.

Cipolat, S., Martins de Brito, O., Dal Zilio, B. and Scorrano, L. (2004). OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15927-32.

Cocchia, D. and Michetti, F. (1981). S-100 antigen in satellite cells of the adrenal medulla and the superior cervical ganglion of the rat. An immunohistochemical and immunocytochemical study. *Cell Tissue Res* **215**, 103-12.

Collins, T. J., Berridge, M. J., Lipp, P. and Bootman, M. D. (2002). Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *Embo J* **21**, 1616-27.

Collins, T. J., Lipp, P., Berridge, M. J. and Bootman, M. D. (2001). Mitochondrial Ca(2+) uptake depends on the spatial and temporal profile of cytosolic Ca(2+) signals. *J Biol Chem* **276**, 26411-20.

Collins, T. J., Lipp, P., Berridge, M. J., Li, W. and Bootman, M. D. (2000). Inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca2+ release is inhibited by mitochondrial depolarization. *Biochem J* **347**, 593-600.

Costello, J. F. (2003). DNA methylation in brain development and gliomagenesis. *Front Biosci* **8**, s175-84.

Costello, J. F., Berger, M. S., Huang, H. S. and Cavenee, W. K. (1996). Silencing of p16/CDKN2 expression in human gliomas by methylation and chromatin condensation. *Cancer Res* **56**, 2405-10.

Csordas, G., Madesh, M., Antonsson, B. and Hajnoczky, G. (2002). tcBid promotes Ca(2+) signal propagation to the mitochondria: control of Ca(2+) permeation through the outer mitochondrial membrane. *Embo J* **21**, 2198-206.

Csordas, G., Thomas, A. P. and Hajnoczky, G. (1999). Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria. *Embo J* **18**, 96-108.

Curran, S. P., Leuenberger, D., Oppliger, W. and Koehler, C. M. (2002). The Tim9p-Tim10p complex binds to the transmembrane domains of the ADP/ATP carrier. *Embo J* **21**, 942-53.

Da Cruz, S., Xenarios, I., Langridge, J., Vilbois, F., Parone, P. A. and Martinou, J. C. (2003). Proteomic analysis of the mouse liver mitochondrial inner membrane. *J Biol Chem* **278**, 41566-71.

Dai, J., Kuo, K. H., Leo, J. M., van Breemen, C. and Lee, C. H. (2005). Rearrangement of the close contact between the mitochondria and the sarcoplasmic reticulum in airway smooth muscle. *Cell Calcium* **37**, 333-40.

Darios, F., Lambeng, N., Troadec, J. D., Michel, P. P. and Ruberg, M. (2003). Ceramide increases mitochondrial free calcium levels via caspase 8 and Bid: role in initiation of cell death. *J Neurochem* **84**, 643-54.

Darios, F., Muriel, M. P., Khondiker, M. E., Brice, A. and Ruberg, M. (2005). Neurotoxic calcium transfer from endoplasmic reticulum to mitochondria is regulated by cyclin-dependent kinase 5-dependent phosphorylation of tau. *J Neurosci* **25**, 4159-68.

- Das, A., Pansky, B., Budd, G. C. and Kollarits, C. R.** (1984). Immunocytochemistry of mouse and human retina with antisera to insulin and S-100 protein. *Curr Eye Res* **3**, 1397-403.
- Davey, G. E., Murmann, P. and Heizmann, C. W.** (2001). Intracellular Ca²⁺ and Zn²⁺ levels regulate the alternative cell density-dependent secretion of S100B in human glioblastoma cells. *J Biol Chem* **276**, 30819-26.
- De Giorgi, F., Lartigue, L. and Ichas, F.** (2000). Electrical coupling and plasticity of the mitochondrial network. *Cell Calcium* **28**, 365-70.
- De Vos, K. J., Sable, J., Miller, K. E. and Sheetz, M. P.** (2003). Expression of phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate-specific pleckstrin homology domains alters direction but not the level of axonal transport of mitochondria. *Mol Biol Cell* **14**, 3636-49.
- DeLaBarre, B. and Brunger, A. T.** (2003). Complete structure of p97/valosin-containing protein reveals communication between nucleotide domains. *Nat Struct Biol* **10**, 856-63.
- Delettre, C., Lenaers, G., Griffoin, J. M., Gigarel, N., Lorenzo, C., Belenguer, P., Pelloquin, L., Grosgeorge, J., Turc-Carel, C., Perret, E. et al.** (2000). Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet* **26**, 207-10.
- Deloulme, J. C., Assard, N., Mbele, G. O., Mangin, C., Kuwano, R. and Baudier, J.** (2000). S100A6 and S100A11 are specific targets of the calcium- and zinc-binding S100B protein in vivo. *J Biol Chem* **275**, 35302-10.
- Deloulme, J. C., Raponi, E., Gentil, B. J., Bertacchi, N., Marks, A., Labourdette, G. and Baudier, J.** (2004). Nuclear expression of S100B in oligodendrocyte progenitor cells correlates with differentiation toward the oligodendroglial lineage and modulates oligodendrocytes maturation. *Mol Cell Neurosci* **27**, 453-65.
- Dempsey, A. C., Walsh, M. P. and Shaw, G. S.** (2003). Unmasking the annexin I interaction from the structure of Apo-S100A11. *Structure* **11**, 887-97.
- Denton, R. M., McCormack, J. G. and Edgell, N. J.** (1980). Role of calcium ions in the regulation of intramitochondrial metabolism. Effects of Na⁺, Mg²⁺ and ruthenium red on the Ca²⁺-stimulated oxidation of oxoglutarate and on pyruvate dehydrogenase activity in intact rat heart mitochondria. *Biochem J* **190**, 107-17.
- Ding, H., Roncari, L., Shannon, P., Wu, X., Lau, N., Karaskova, J., Gutmann, D. H., Squire, J. A., Nagy, A. and Guha, A.** (2001). Astrocyte-specific expression of activated p21-ras results in malignant astrocytoma formation in a transgenic mouse model of human gliomas. *Cancer Res* **61**, 3826-36.
- Donato, R.** (1983). Effect of S-100 protein on assembly of brain microtubule proteins in vitro. *FEBS Lett* **162**, 310-3.
- Donato, R.** (1988). Calcium-independent, pH-regulated effects of S-100 proteins on assembly-disassembly of brain microtubule protein in vitro. *J Biol Chem* **263**, 106-10.
- Donato, R.** (2001). S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* **33**, 637-68.
- Donato, R., Isobe, T. and Okuyama, T.** (1985). S-100 proteins and microtubules: analysis of the effects of rat brain S-100 (S-100b) and ox brain S-100a0, S-100a and S-100b on microtubule assembly-disassembly. *FEBS Lett* **186**, 65-9.
- Dong, Z., Pang, J. S., Ng, M. H., Poon, W. S., Zhou, L. and Ng, H. K.** (2004). Identification of two contiguous minimally deleted regions on chromosome 1p36.31-p36.32 in oligodendroglial tumours. *Br J Cancer* **91**, 1105-11.
- Dougan, D. A., Mogk, A., Zeth, K., Turgay, K. and Bukau, B.** (2002). AAA+ proteins and substrate recognition, it all depends on their partner in crime. *FEBS Lett* **529**, 6-10.
- Dreveny, I., Kondo, H., Uchiyama, K., Shaw, A., Zhang, X. and Freemont, P. S.** (2004). Structural basis of the interaction between the AAA ATPase p97/VCP and its adaptor protein p47. *Embo J* **23**, 1030-9.
- Drohat, A. C., Baldissari, D. M., Rustandi, R. R. and Weber, D. J.** (1998). Solution structure of calcium-bound rat S100B(beta-beta) as determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* **37**, 2729-40.
- Drohat, A. C., Nenortas, E., Beckett, D. and Weber, D. J.** (1997). Oligomerization state of S100B at nanomolar concentration determined by large-zone analytical gel filtration chromatography. *Protein Sci* **6**, 1577-82.
- Drohat, A. C., Tjandra, N., Baldissari, D. M. and Weber, D. J.** (1999). The use of dipolar couplings for determining the solution structure of rat apo-S100B(beta-beta). *Protein Sci* **8**, 800-9.
- Drubin, D. G., Jones, H. D. and Wertman, K. F.** (1993). Actin structure and function: roles in mitochondrial organization and morphogenesis in budding yeast and identification of the phalloidin-binding site. *Mol Biol Cell* **4**, 1277-94.
- Drummond, R. M., Mix, T. C., Tuft, R. A., Walsh, J. V., Jr. and Fay, F. S.** (2000). Mitochondrial Ca²⁺ homeostasis during Ca²⁺ influx and Ca²⁺ release in gastric myocytes from *Bufo marinus*. *J Physiol* **522 Pt 3**, 375-90.

- Duda, T., Goracznik, R. M. and Sharma, R. K.** (1996). Molecular characterization of S100A1-S100B protein in retina and its activation mechanism of bovine photoreceptor guanylate cyclase. *Biochemistry* **35**, 6263-6.
- Duda, T. and Sharma, R. K.** (2004). S100B-modulated Ca²⁺-dependent ROS-GC1 transduction machinery in the gustatory epithelium: a new mechanism in gustatory transduction. *FEBS Lett* **577**, 393-8.
- Dyck, R. H., Bogoch, II, Marks, A., Melvin, N. R. and Teskey, G. C.** (2002). Enhanced epileptogenesis in S100B knockout mice. *Brain Res Mol Brain Res* **106**, 22-9.
- Eckert, R. L., Broome, A. M., Ruse, M., Robinson, N., Ryan, D. and Lee, K.** (2004). S100 proteins in the epidermis. *J Invest Dermatol* **123**, 23-33.
- Egner, A., Jakobs, S. and Hell, S. W.** (2002). Fast 100-nm resolution three-dimensional microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3370-5.
- Emoto, K., Kuge, O., Nishijima, M. and Umeda, M.** (1999). Isolation of a Chinese hamster ovary cell mutant defective in intramitochondrial transport of phosphatidylserine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12400-5.
- Endo, T. and Hidaka, H.** (1983). Effect of S-100 protein on microtubule assembly-disassembly. *FEBS Lett* **161**, 235-8.
- Erzberger, J. P. and Berger, J. M.** (2006). Evolutionary relationships and structural mechanisms of AAA+ proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **35**, 93-114.
- Fabricius, C., Berthold, C. H. and Rydmark, M.** (1993). Axoplasmic organelles at nodes of Ranvier. II. Occurrence and distribution in large myelinated spinal cord axons of the adult cat. *J Neurocytol* **22**, 941-54.
- Fannjiang, Y., Cheng, W. C., Lee, S. J., Qi, B., Pevsner, J., McCaffery, J. M., Hill, R. B., Basanez, G. and Hardwick, J. M.** (2004). Mitochondrial fission proteins regulate programmed cell death in yeast. *Genes Dev* **18**, 2785-97.
- Fano, G., Biocca, S., Fulle, S., Mariggio, M. A., Belia, S. and Calissano, P.** (1995). The S-100: a protein family in search of a function. *Prog Neurobiol* **46**, 71-82.
- Ferguson, P. L. and Shaw, G. S.** (2004). Human S100B protein interacts with the Escherichia coli division protein FtsZ in a calcium-sensitive manner. *J Biol Chem* **279**, 18806-13.
- Fernandez-Fernandez, M. R., Vepintsev, D. B. and Fersht, A. R.** (2005). Proteins of the S100 family regulate the oligomerization of p53 tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4735-40.
- Filipek, A., Jastrzebska, B., Nowotny, M. and Kuznicki, J.** (2002). CacyBP/SIP, a calyculin and Siah-1-interacting protein, binds EF-hand proteins of the S100 family. *J Biol Chem* **277**, 28848-52.
- Filippin, L., Magalhaes, P. J., Di Benedetto, G., Colella, M. and Pozzan, T.** (2003). Stable interactions between mitochondria and endoplasmic reticulum allow rapid accumulation of calcium in a subpopulation of mitochondria. *J Biol Chem* **278**, 39224-34.
- Frank, S., Gaume, B., Bergmann-Leitner, E. S., Leitner, W. W., Robert, E. G., Catez, F., Smith, C. L. and Youle, R. J.** (2001). The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell* **1**, 515-25.
- Franke, W. W. and Kartenbeck, J.** (1971). Outer mitochondrial membrane continuous with endoplasmic reticulum. *Protoplasma* **73**, 35-41.
- Fransson, A., Ruusala, A. and Aspenstrom, P.** (2003). Atypical Rho GTPases have roles in mitochondrial homeostasis and apoptosis. *J Biol Chem* **278**, 6495-502.
- Fransson, S., Ruusala, A. and Aspenstrom, P.** (2006). The atypical Rho GTPases Miro-1 and Miro-2 have essential roles in mitochondrial trafficking. *Biochem Biophys Res Commun* **344**, 500-10.
- Frederick, R. L., McCaffery, J. M., Cunningham, K. W., Okamoto, K. and Shaw, J. M.** (2004). Yeast Miro GTPase, Gem1p, regulates mitochondrial morphology via a novel pathway. *J Cell Biol* **167**, 87-98.
- French, P. J., Swagemakers, S. M., Nagel, J. H., Kouwenhoven, M. C., Brouwer, E., van der Spek, P., Luijck, T. M., Kros, J. M., van den Bent, M. J. and Sillevius Smitt, P. A.** (2005). Gene expression profiles associated with treatment response in oligodendrogliomas. *Cancer Res* **65**, 11335-44.
- Frickey, T. and Lupas, A. N.** (2004). Phylogenetic analysis of AAA proteins. *J Struct Biol* **146**, 2-10.
- Frieden, M., Arnaudeau, S., Castelbou, C. and Demaurex, N.** (2005). Subplasmalemmal mitochondria modulate the activity of plasma membrane Ca²⁺-ATPases. *J Biol Chem* **280**, 43198-208.
- Fritz, G., Mittl, P. R., Vasak, M., Grutter, M. G. and Heizmann, C. W.** (2002). The crystal structure of metal-free human EF-hand protein S100A3 at 1.7-Å resolution. *J Biol Chem* **277**, 33092-8.
- Frizzo, J. K., Tramontina, A. C., Tramontina, F., Gottfried, C., Leal, R. B., Donato, R. and Goncalves, C. A.** (2004a). Involvement of the S100B in cAMP-induced cytoskeleton remodeling in astrocytes: a study using TRTK-12 in digitonin-permeabilized cells. *Cell Mol Neurobiol* **24**, 833-40.
- Frizzo, J. K., Tramontina, F., Bortoli, E., Gottfried, C., Leal, R. B., Lengyel, I., Donato, R., Dunkley, P. R. and Goncalves, C. A.** (2004b). S100B-mediated inhibition of the phosphorylation of GFAP is prevented by TRTK-12. *Neurochem Res* **29**, 735-40.
- Frohlich, K. U.** (2001). An AAA family tree. *J Cell Sci* **114**, 1601-2.

- Fruhwald, M. C., O'Dorisio, M. S., Dai, Z., Tanner, S. M., Balster, D. A., Gao, X., Wright, F. A. and Plass, C.** (2001). Aberrant promoter methylation of previously unidentified target genes is a common abnormality in medulloblastomas--implications for tumor biology and potential clinical utility. *Oncogene* **20**, 5033-42.
- Fujii, T., Machino, K., Andoh, H., Satoh, T. and Kondo, Y.** (1990). Calcium-dependent control of caldesmon-actin interaction by S100 protein. *J Biochem (Tokyo)* **107**, 133-7.
- Fulle, S., Pietrangelo, T., Mariggio, M. A., Lorenzon, P., Racanicchi, L., Mozrzymas, J., Guarnieri, S., Zucconi-Grassi, G. and Fano, G.** (2000). Calcium and fos involvement in brain-derived Ca(2+)-binding protein (S100)-dependent apoptosis in rat pheochromocytoma cells. *Exp Physiol* **85**, 243-53.
- Fuller, G. N., Rhee, C. H., Hess, K. R., Caskey, L. S., Wang, R., Bruner, J. M., Yung, W. K. and Zhang, W.** (1999). Reactivation of insulin-like growth factor binding protein 2 expression in glioblastoma multiforme: a revelation by parallel gene expression profiling. *Cancer Res* **59**, 4228-32.
- Gagne, S. M., Tsuda, S., Li, M. X., Smillie, L. B. and Sykes, B. D.** (1995). Structures of the troponin C regulatory domains in the apo and calcium-saturated states. *Nat Struct Biol* **2**, 784-9.
- Gaigg, B., Simbeni, R., Hrastnik, C., Paltauf, F. and Daum, G.** (1995). Characterization of a microsomal subfraction associated with mitochondria of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. Involvement in synthesis and import of phospholipids into mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1234**, 214-20.
- Garbuglia, M., Verzini, M., Dimlich, R. V., Jamieson, G. A., Jr. and Donato, R.** (1996). Characterization of type III intermediate filament regulatory protein target epitopes: S-100 (beta and/or alpha) binds the N-terminal head domain; annexin II2-p11(2) binds the rod domain. *Biochim Biophys Acta* **1313**, 268-76.
- Garbuglia, M., Verzini, M. and Donato, R.** (1998). Annexin VI binds S100A1 and S100B and blocks the ability of S100A1 and S100B to inhibit desmin and GFAP assemblies into intermediate filaments. *Cell Calcium* **24**, 177-91.
- Garbuglia, M., Verzini, M., Hofmann, A., Huber, R. and Donato, R.** (2000). S100A1 and S100B interactions with annexins. *Biochim Biophys Acta* **1498**, 192-206.
- Garbuglia, M., Verzini, M., Rustandi, R. R., Osterloh, D., Weber, D. J., Gerke, V. and Donato, R.** (1999a). Role of the C-terminal extension in the interaction of S100A1 with GFAP, tubulin, the S100A1- and S100B-inhibitory peptide, TRTK-12, and a peptide derived from p53, and the S100A1 inhibitory effect on GFAP polymerization. *Biochem Biophys Res Commun* **254**, 36-41.
- Garbuglia, M., Verzini, M., Sorci, G., Bianchi, R., Giambanco, I., Agneletti, A. L. and Donato, R.** (1999b). The calcium-modulated proteins, S100A1 and S100B, as potential regulators of the dynamics of type III intermediate filaments. *Braz J Med Biol Res* **32**, 1177-85.
- Gavel, Y. and von Heijne, G.** (1992). The distribution of charged amino acids in mitochondrial inner-membrane proteins suggests different modes of membrane integration for nuclearly and mitochondrially encoded proteins. *Eur J Biochem* **205**, 1207-15.
- Gentil, B. J., Delphin, C., Mbele, G. O., Deloulme, J. C., Ferro, M., Garin, J. and Baudier, J.** (2001). The giant protein AHNAK is a specific target for the calcium- and zinc-binding S100B protein: potential implications for Ca²⁺ homeostasis regulation by S100B. *J Biol Chem* **276**, 23253-61.
- Gerlach, R., Demel, G., Konig, H. G., Gross, U., Prehn, J. H., Raabe, A., Seifert, V. and Kogel, D.** (2006). Active secretion of S100B from astrocytes during metabolic stress. *Neuroscience* **141**, 1697-701.
- Gerlai, R., Friend, W., Becker, L., O'Hanlon, D., Marks, A. and Roder, J.** (1993). Female transgenic mice carrying multiple copies of the human gene for S100 beta are hyperactive. *Behav Brain Res* **55**, 51-9.
- Gerlai, R., Marks, A. and Roder, J.** (1994). T-maze spontaneous alternation rate is decreased in S100 beta transgenic mice. *Behav Neurosci* **108**, 100-6.
- Gerlai, R., Wojtowicz, J. M., Marks, A. and Roder, J.** (1995). Overexpression of a calcium-binding protein, S100 beta, in astrocytes alters synaptic plasticity and impairs spatial learning in transgenic mice. *Learn Mem* **2**, 26-39.
- Germain, M., Mathai, J. P., McBride, H. M. and Shore, G. C.** (2005). Endoplasmic reticulum BIK initiates DRP1-regulated remodelling of mitochondrial cristae during apoptosis. *Embo J* **24**, 1546-56.
- Geuijen, C. A., Bijl, N., Smit, R. C., Cox, F., Throsby, M., Visser, T. J., Jongeneelen, M. A., Bakker, A. B., Kruisbeek, A. M., Goudsmit, J. et al.** (2005). A proteomic approach to tumour target identification using phage display, affinity purification and mass spectrometry. *Eur J Cancer* **41**, 178-87.
- Ghadially, F. N.** (1997). Case for the panel. Mitochondrial inclusions in prostate adenocarcinoma. *Ultrastruct Pathol* **21**, 475-7.
- Gilabert, J. A. and Parekh, A. B.** (2000). Respiring mitochondria determine the pattern of activation and inactivation of the store-operated Ca(2+) current I(CRAC). *Embo J* **19**, 6401-7.
- Gilbertson, R. J.** (2006). Brain tumors provide new clues to the source of cancer stem cells: does oncology recapitulate ontogeny? *Cell Cycle* **5**, 135-7.

- Gires, O., Munz, M., Schaffrik, M., Kieu, C., Rauch, J., Ahlemann, M., Eberle, D., Mack, B., Wollenberg, B., Lang, S. et al.** (2004). Profile identification of disease-associated humoral antigens using AMIDA, a novel proteomics-based technology. *Cell Mol Life Sci* **61**, 1198-207.
- Glater, E. E., Megeath, L. J., Stowers, R. S. and Schwarz, T. L.** (2006). Axonal transport of mitochondria requires milton to recruit kinesin heavy chain and is light chain independent. *J Cell Biol* **173**, 545-57.
- Glick, B. S., Beasley, E. M. and Schatz, G.** (1992). Protein sorting in mitochondria. *Trends Biochem Sci* **17**, 453-9.
- Gomez, L. A., Brusco, A. and Saavedra, J. P.** (1990). Immunocytochemical study of S-100 positive glial cells in the brainstem and spinal cord of the rat embryo. *Int J Dev Neurosci* **8**, 55-64.
- Goncalves, D. S., Lenz, G., Karl, J., Goncalves, C. A. and Rodnight, R.** (2000). Extracellular S100B protein modulates ERK in astrocyte cultures. *Neuroreport* **11**, 807-9.
- Gorska-Andrzejak, J., Stowers, R. S., Borycz, J., Kostyleva, R., Schwarz, T. L. and Meinertzhagen, I. A.** (2003). Mitochondria are redistributed in Drosophila photoreceptors lacking milton, a kinesin-associated protein. *J Comp Neurol* **463**, 372-88.
- Gotow, T., Miyaguchi, K. and Hashimoto, P. H.** (1991). Cytoplasmic architecture of the axon terminal: filamentous strands specifically associated with synaptic vesicles. *Neuroscience* **40**, 587-98.
- Grafstein, B. and Forman, D. S.** (1980). Intracellular transport in neurons. *Physiol Rev* **60**, 1167-283.
- Griffin, E. E., Graumann, J. and Chan, D. C.** (2005). The WD40 protein Caf4p is a component of the mitochondrial fission machinery and recruits Dnm1p to mitochondria. *J Cell Biol* **170**, 237-48.
- Griffin, W. S., Stanley, L. C., Ling, C., White, L., MacLeod, V., Perrot, L. J., White, C. L., 3rd and Araoz, C.** (1989). Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 7611-5.
- Griffin, W. S., Yeralan, O., Sheng, J. G., Boop, F. A., Mrak, R. E., Rovnaghi, C. R., Burnett, B. A., Feoktistova, A. and Van Eldik, L. J.** (1995). Overexpression of the neurotrophic cytokine S100 beta in human temporal lobe epilepsy. *J Neurochem* **65**, 228-33.
- Grigorian, M., Andresen, S., Tulchinsky, E., Kriajevska, M., Carlberg, C., Kruse, C., Cohn, M., Ambartsumian, N., Christensen, A., Selivanova, G. et al.** (2001). Tumor suppressor p53 protein is a new target for the metastasis-associated Mts1/S100A4 protein: functional consequences of their interaction. *J Biol Chem* **276**, 22699-708.
- Guo, X., Macleod, G. T., Wellington, A., Hu, F., Panchumarthi, S., Schoenfield, M., Marin, L., Charlton, M. P., Atwood, H. L. and Zinsmaier, K. E.** (2005). The GTPase dMiro is required for axonal transport of mitochondria to Drosophila synapses. *Neuron* **47**, 379-93.
- Haak, L. L., Grimaldi, M., Smaili, S. S. and Russell, J. T.** (2002). Mitochondria regulate Ca²⁺ wave initiation and inositol trisphosphate signal transduction in oligodendrocyte progenitors. *J Neurochem* **80**, 405-15.
- Habermann, A., Schroer, T. A., Griffiths, G. and Burkhardt, J. K.** (2001). Immunolocalization of cytoplasmic dynein and dynactin subunits in cultured macrophages: enrichment on early endocytic organelles. *J Cell Sci* **114**, 229-240.
- Hachem, S., Aguirre, A., Vives, V., Marks, A., Gallo, V. and Legraverend, C.** (2005). Spatial and temporal expression of S100B in cells of oligodendrocyte lineage. *Glia* **51**, 81-97.
- Hajnoczky, G., Hager, R. and Thomas, A. P.** (1999). Mitochondria suppress local feedback activation of inositol 1,4, 5-trisphosphate receptors by Ca²⁺. *J Biol Chem* **274**, 14157-62.
- Hajnoczky, G., Robb-Gaspers, L. D., Seitz, M. B. and Thomas, A. P.** (1995). Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria. *Cell* **82**, 415-24.
- Hansford, R. G. and Castro, F.** (1982). Intramitochondrial and extramitochondrial free calcium ion concentrations of suspensions of heart mitochondria with very low, plausibly physiological, contents of total calcium. *J Bioenerg Biomembr* **14**, 361-76.
- Hanson, P. I. and Whiteheart, S. W.** (2005). AAA+ proteins: have engine, will work. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 519-29.
- Hara, K., Ito, M., Takeuchi, J., Iijima, S., Endo, T. and Hidaka, H.** (1983). Distribution of S-100b protein in normal salivary glands and salivary gland tumors. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* **401**, 237-49.
- Harpio, R. and Einarsson, R.** (2004). S100 proteins as cancer biomarkers with focus on S100B in malignant melanoma. *Clin Biochem* **37**, 512-8.
- Hartl, F. U., Pfanner, N. and Neupert, W.** (1987). Translocation intermediates on the import pathway of proteins into mitochondria. *Biochem Soc Trans* **15**, 95-7.
- Hartman, J. J. and Vale, R. D.** (1999). Microtubule disassembly by ATP-dependent oligomerization of the AAA enzyme katanin. *Science* **286**, 782-5.

- Heierhorst, J., Tang, X., Lei, J., Probst, W. C., Weiss, K. R., Kemp, B. E. and Benian, G. M.** (1996). Substrate specificity and inhibitor sensitivity of Ca²⁺/S100-dependent twitchin kinases. *Eur J Biochem* **242**, 454-9.
- Heizmann, C. W. and Cox, J. A.** (1998). New perspectives on S100 proteins: a multi-functional Ca(2+)-, Zn(2+)- and Cu(2+)-binding protein family. *Biometals* **11**, 383-97.
- Henneberry, A. L., Wright, M. M. and McMaster, C. R.** (2002). The major sites of cellular phospholipid synthesis and molecular determinants of Fatty Acid and lipid head group specificity. *Mol Biol Cell* **13**, 3148-61.
- Hermann, G. J. and Shaw, J. M.** (1998). Mitochondrial dynamics in yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**, 265-303.
- Herrmann, J. M., Koll, H., Cook, R. A., Neupert, W. and Stuart, R. A.** (1995). Topogenesis of cytochrome oxidase subunit II. Mechanisms of protein export from the mitochondrial matrix. *J Biol Chem* **270**, 27079-86.
- Hofmann, M. A., Drury, S., Fu, C., Qu, W., Taguchi, A., Lu, Y., Avila, C., Kambham, N., Bierhaus, A., Nawroth, P. et al.** (1999). RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* **97**, 889-901.
- Hollenbeck, P. J.** (1996). The pattern and mechanism of mitochondrial transport in axons. *Front Biosci* **1**, d91-102.
- Hollenbeck, P. J. and Saxton, W. M.** (2005). The axonal transport of mitochondria. *J Cell Sci* **118**, 5411-9.
- Horiuchi, D., Barkus, R. V., Pilling, A. D., Gassman, A. and Saxton, W. M.** (2005). APLIP1, a kinesin binding JIP-1/JNK scaffold protein, influences the axonal transport of both vesicles and mitochondria in *Drosophila*. *Curr Biol* **15**, 2137-41.
- Hoth, M., Fanger, C. M. and Lewis, R. S.** (1997). Mitochondrial regulation of store-operated calcium signaling in T lymphocytes. *J Cell Biol* **137**, 633-48.
- Hovius, R., Faber, B., Brigot, B., Nicolay, K. and de Kruijff, B.** (1992). On the mechanism of the mitochondrial decarboxylation of phosphatidylserine. *J Biol Chem* **267**, 16790-5.
- Hunter, M. J. and Chazin, W. J.** (1998). High level expression and dimer characterization of the S100 EF-hand proteins, migration inhibitory factor-related proteins 8 and 14. *J Biol Chem* **273**, 12427-35.
- Husemann, K., Wolter, M., Buschges, R., Bostrom, J., Sabel, M. and Reifenberger, G.** (1999). Identification of two distinct deleted regions on the short arm of chromosome 1 and rare mutation of the CDKN2C gene from 1p32 in oligodendroglial tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* **58**, 1041-50.
- Huttunen, H. J., Kuja-Panula, J., Sorci, G., Agneletti, A. L., Donato, R. and Rauvala, H.** (2000). Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphotericin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J Biol Chem* **275**, 40096-105.
- Huyton, T., Pye, V. E., Briggs, L. C., Flynn, T. C., Beuron, F., Kondo, H., Ma, J., Zhang, X. and Freemont, P. S.** (2003). The crystal structure of murine p97/VCP at 3.6Å. *J Struct Biol* **144**, 337-48.
- Hyden, H. and Lange, P. W.** (1970). S100 brain protein: correlation with behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* **67**, 1959-66.
- Ichas, F., Jouaville, L. S. and Mazat, J. P.** (1997). Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell* **89**, 1145-53.
- Ignatova, T. N., Kukekov, V. G., Laywell, E. D., Suslov, O. N., Vrionis, F. D. and Steindler, D. A.** (2002). Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia* **39**, 193-206.
- Ikura, M.** (1996). Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. *Trends Biochem Sci* **21**, 14-7.
- Ikura, M. and Ames, J. B.** (2006). Genetic polymorphism and protein conformational plasticity in the calmodulin superfamily: two ways to promote multifunctionality. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1159-64.
- Ikura, M., Barbato, G., Klee, C. B. and Bax, A.** (1992). Solution structure of calmodulin and its complex with a myosin light chain kinase fragment. *Cell Calcium* **13**, 391-400.
- Inman, K. G., Yang, R., Rustandi, R. R., Miller, K. E., Baldissari, D. M. and Weber, D. J.** (2002). Solution NMR structure of S100B bound to the high-affinity target peptide TRTK-12. *J Mol Biol* **324**, 1003-14.
- Ino, Y., Betensky, R. A., Zlatescu, M. C., Sasaki, H., Macdonald, D. R., Stemmer-Rachamimov, A. O., Ramsay, D. A., Cairncross, J. G. and Louis, D. N.** (2001). Molecular subtypes of anaplastic oligodendroglioma: implications for patient management at diagnosis. *Clin Cancer Res* **7**, 839-45.
- Ino, Y., Zlatescu, M. C., Sasaki, H., Macdonald, D. R., Stemmer-Rachamimov, A. O., Jung, S., Ramsay, D. A., von Deimling, A., Louis, D. N. and Cairncross, J. G.** (2000). Long survival and therapeutic responses in patients with histologically disparate high-grade gliomas demonstrating chromosome 1p loss. *J Neurosurg* **92**, 983-90.

- Ishihara, N., Eura, Y. and Mihara, K.** (2004). Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J Cell Sci* **117**, 6535-46.
- Ishikawa, K., Nakagawa, A., Tanaka, I., Suzuki, M. and Nishihira, J.** (2000). The structure of human MRP8, a member of the S100 calcium-binding protein family, by MAD phasing at 1.9 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **56**, 559-66.
- Isobe, T., Ishioka, N. and Okuyama, T.** (1981). Structural relation of two S-100 proteins in bovine brain; subunit composition of S-100a protein. *Eur J Biochem* **115**, 469-74.
- Isobe, T., Nakajima, T. and Okuyama, T.** (1977). Reinvestigation of extremely acidic proteins in bovine brain. *Biochim Biophys Acta* **494**, 222-32.
- Isobe, T. and Okuyama, T.** (1978). The amino-acid sequence of S-100 protein (PAP I-b protein) and its relation to the calcium-binding proteins. *Eur J Biochem* **89**, 379-88.
- Itou, H., Yao, M., Fujita, I., Watanabe, N., Suzuki, M., Nishihira, J. and Tanaka, I.** (2002). The crystal structure of human MRP14 (S100A9), a Ca(2+)-dependent regulator protein in inflammatory process. *J Mol Biol* **316**, 265-76.
- Iuchi, T., Namba, H., Iwadate, Y., Shishikura, T., Kageyama, H., Nakamura, Y., Ohira, M., Yamaura, A., Osato, K., Sakiyama, S. et al.** (2002). Identification of the small interstitial deletion at chromosome band 1p34-p35 and its association with poor outcome in oligodendroglial tumors. *Genes Chromosomes Cancer* **35**, 170-5.
- Ivanenkov, V. V., Dimlich, R. V. and Jamieson, G. A., Jr.** (1996). Interaction of S100a0 protein with the actin capping protein, CapZ: characterization of a putative S100a0 binding site in CapZ alpha-subunit. *Biochem Biophys Res Commun* **221**, 46-50.
- Ivanenkov, V. V., Jamieson, G. A., Jr., Gruenstein, E. and Dimlich, R. V.** (1995). Characterization of S-100b binding epitopes. Identification of a novel target, the actin capping protein, CapZ. *J Biol Chem* **270**, 14651-8.
- Jaconi, M., Bony, C., Richards, S. M., Terzic, A., Arnaudeau, S., Vassort, G. and Puceat, M.** (2000). Inositol 1,4,5-trisphosphate directs Ca(2+) flow between mitochondria and the Endoplasmic/Sarcoplasmic reticulum: a role in regulating cardiac autonomic Ca(2+) spiking. *Mol Biol Cell* **11**, 1845-58.
- Jagasia, R., Grote, P., Westermann, B. and Conradt, B.** (2005). DRP-1-mediated mitochondrial fragmentation during EGL-1-induced cell death in *C. elegans*. *Nature* **433**, 754-60.
- James, D. I., Parone, P. A., Mattenberger, Y. and Martinou, J. C.** (2003). hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *J Biol Chem* **278**, 36373-9.
- Jellali, A., Metz-Boutigue, M. H., Surgucheva, I., Jancsik, V., Schwartz, C., Filliol, D., Gelfand, V. I. and Rendon, A.** (1994). Structural and biochemical properties of kinesin heavy chain associated with rat brain mitochondria. *Cell Motil Cytoskeleton* **28**, 79-93.
- Jeuken, J. W., Sprenger, S. H., Boerman, R. H., von Deimling, A., Teepen, H. L., van Overbeeke, J. J. and Wesseling, P.** (2001). Subtyping of oligo-astrocytic tumours by comparative genomic hybridization. *J Pathol* **194**, 81-7.
- Jiang, H., Shah, S. and Hilt, D. C.** (1993). Organization, sequence, and expression of the murine S100 beta gene. Transcriptional regulation by cell type-specific cis-acting regulatory elements. *J Biol Chem* **268**, 20502-11.
- Jouaville, L. S., Ichas, F., Holmuhamedov, E. L., Camacho, P. and Lechleiter, J. D.** (1995). Synchronization of calcium waves by mitochondrial substrates in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature* **377**, 438-41.
- Kaasik, A., Veksler, V., Boehm, E., Novotova, M., Minajeva, A. and Ventura-Clapier, R.** (2001). Energetic crosstalk between organelles: architectural integration of energy production and utilization. *Circ Res* **89**, 153-9.
- Kageyama, G. H. and Wong-Riley, M.** (1985). An analysis of the cellular localization of cytochrome oxidase in the lateral geniculate nucleus of the adult cat. *J Comp Neurol* **242**, 338-57.
- Kageyama, G. H. and Wong-Riley, M. T.** (1982). Histochemical localization of cytochrome oxidase in the hippocampus: correlation with specific neuronal types and afferent pathways. *Neuroscience* **7**, 2337-61.
- Kahn, H. J., Baumal, R., Van Eldik, L. J., Dunn, R. J. and Marks, A.** (1991). Immunoreactivity of S100 beta in heart, skeletal muscle, and kidney in chronic lung disease: possible induction by cAMP. *Mod Pathol* **4**, 698-701.
- Kamath, R. S. and Ahringer, J.** (2003). Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods* **30**, 313-21.
- Kamath, R. S., Fraser, A. G., Dong, Y., Poulin, G., Durbin, R., Gotta, M., Kanapin, A., Le Bot, N., Moreno, S., Sohrmann, M. et al.** (2003). Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* **421**, 231-7.
- Kamei, S., Chen-Kuo-Chang, M., Cazeville, C., Lenaers, G., Olichon, A., Belenguer, P., Roussignol, G., Renard, N., Eybalin, M., Michelin, A. et al.** (2005). Expression of the Opa1 mitochondrial

protein in retinal ganglion cells: its downregulation causes aggregation of the mitochondrial network. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**, 4288-94.

Kaplan, R. S. and Pedersen, P. L. (1985). Isolation and reconstitution of the n-butylmalonate-sensitive dicarboxylate transporter from rat liver mitochondria. *J Biol Chem* **260**, 10293-8.

Karbowski, M., Arnoult, D., Chen, H., Chan, D. C., Smith, C. L. and Youle, R. J. (2004). Quantitation of mitochondrial dynamics by photolabeling of individual organelles shows that mitochondrial fusion is blocked during the Bax activation phase of apoptosis. *J Cell Biol* **164**, 493-9.

Karbowski, M., Lee, Y. J., Gaume, B., Jeong, S. Y., Frank, S., Nechushtan, A., Santel, A., Fuller, M., Smith, C. L. and Youle, R. J. (2002). Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. *J Cell Biol* **159**, 931-8.

Kennedy, E. D. and Wollheim, C. B. (1998). Role of mitochondrial calcium in metabolism-secretion coupling in nutrient-stimulated insulin release. *Diabetes Metab* **24**, 15-24.

Kennedy, E. P. (1956). The biological synthesis of phospholipids. *Can J Biochem Physiol* **34**, 334-48.

Khodjakov, A., Lizunova, E. M., Minin, A. A., Koonce, M. P. and Gyoeva, F. K. (1998). A specific light chain of kinesin associates with mitochondria in cultured cells. *Mol Biol Cell* **9**, 333-43.

Kiewitz, R., Lyons, G. E., Schafer, B. W. and Heizmann, C. W. (2000). Transcriptional regulation of S100A1 and expression during mouse heart development. *Biochim Biophys Acta* **1498**, 207-19.

Kilby, P. M., Van Eldik, L. J. and Roberts, G. C. (1996). The solution structure of the bovine S100B protein dimer in the calcium-free state. *Structure* **4**, 1041-52.

Kim, J. Y., Hwang, J. M., Ko, H. S., Seong, M. W., Park, B. J. and Park, S. S. (2005). Mitochondrial DNA content is decreased in autosomal dominant optic atrophy. *Neurology* **64**, 966-72.

King, M. J., Atwood, H. L. and Govind, C. K. (1996). Structural features of crayfish phasic and tonic neuromuscular terminals. *J Comp Neurol* **372**, 618-26.

Kleihues, P. and Ohgaki, H. (2000). Phenotype vs genotype in the evolution of astrocytic brain tumors. *Toxicol Pathol* **28**, 164-70.

Kleihues, P., Soylemezoglu, F., Schauble, B., Scheithauer, B. W. and Burger, P. C. (1995). Histopathology, classification, and grading of gliomas. *Glia* **15**, 211-21.

Kleindienst, A., McGinn, M. J., Harvey, H. B., Colello, R. J., Hamm, R. J. and Bullock, M. R. (2005). Enhanced hippocampal neurogenesis by intraventricular S100B infusion is associated with improved cognitive recovery after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* **22**, 645-55.

Kligman, D. and Hilt, D. C. (1988). The S100 protein family. *Trends Biochem Sci* **13**, 437-43.

Kligman, D. and Hsieh, L. S. (1987). Neurite extension factor induces rapid morphological differentiation of mouse neuroblastoma cells in defined medium. *Brain Res* **430**, 296-300.

Knoll, G. and Brdiczka, D. (1983). Changes in freeze-fractured mitochondrial membranes correlated to their energetic state. Dynamic interactions of the boundary membranes. *Biochim Biophys Acta* **733**, 102-10.

Koch M., O. T., Leclerc E., Diez J., Dattilo B., Chazin W., Heizmann CW., Kroneck PMH., Fritz G. (2006). Structural basis of the interaction between S100B and RAGE. In *9th meeting of the european calcium society*.

Koehler, C. M. (2004). New developments in mitochondrial assembly. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 309-35.

Kogel, D., Peters, M., Konig, H. G., Hashemi, S. M., Bui, N. T., Arolt, V., Rothermundt, M. and Prehn, J. H. (2004). S100B potently activates p65/c-Rel transcriptional complexes in hippocampal neurons: Clinical implications for the role of S100B in excitotoxic brain injury. *Neuroscience* **127**, 913-20.

Koshiba, T., Detmer, S. A., Kaiser, J. T., Chen, H., McCaffery, J. M. and Chan, D. C. (2004). Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science* **305**, 858-62.

Kottke, M., Wallimann, T. and Brdiczka, D. (1994). Dual electron microscopic localization of mitochondrial creatine kinase in brain mitochondria. *Biochem Med Metab Biol* **51**, 105-17.

Koushika, S. P., Schaefer, A. M., Vincent, R., Willis, J. H., Bowerman, B. and Nonet, M. L. (2004). Mutations in *Caenorhabditis elegans* cytoplasmic dynein components reveal specificity of neuronal retrograde cargo. *J Neurosci* **24**, 3907-16.

Kuge, O., Nishijima, M. and Akamatsu, Y. (1986). Phosphatidylserine biosynthesis in cultured Chinese hamster ovary cells. III. Genetic evidence for utilization of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine as precursors. *J Biol Chem* **261**, 5795-8.

Kuge, O., Yamakawa, Y. and Nishijima, M. (2001). Enhancement of transport-dependent decarboxylation of phosphatidylserine by S100B protein in permeabilized Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **276**, 23700-6.

Kumar, A., Agarwal, S., Heyman, J. A., Matson, S., Heidtman, M., Piccirillo, S., Umansky, L., Drawid, A., Jansen, R., Liu, Y. et al. (2002). Subcellular localization of the yeast proteome. *Genes Dev* **16**, 707-19.

- Kursula, P., Tikkanen, G., Lehto, V. P., Nishikimi, M. and Heape, A. M.** (1999). Calcium-dependent interaction between the large myelin-associated glycoprotein and S100beta. *J Neurochem* **73**, 1724-32.
- Labourdette, G., Mahony, J. B., Brown, I. R. and Marks, A.** (1977). Regulation of synthesis of a brain-specific protein in monolayer cultures of clonal rat glial cells. *Eur J Biochem* **81**, 591-7.
- Labourdette, G. and Mandel, P.** (1980). Effect of norepinephrine and dibutyryl cyclic AMP on S-100 protein level in C6 glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **96**, 1702-9.
- Labrousse, A. M., Zappaterra, M. D., Rube, D. A. and van der Blik, A. M.** (1999). C. elegans dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Mol Cell* **4**, 815-26.
- Lam, A. G., Koppal, T., Akama, K. T., Guo, L., Craft, J. M., Samy, B., Schavocky, J. P., Watterson, D. M. and Van Eldik, L. J.** (2001). Mechanism of glial activation by S100B: involvement of the transcription factor NFkappaB. *Neurobiol Aging* **22**, 765-72.
- LaMonte, B. H., Wallace, K. E., Holloway, B. A., Shelly, S. S., Ascano, J., Tokito, M., Van Winkle, T., Howland, D. S. and Holzbaur, E. L.** (2002). Disruption of dynein/dynactin inhibits axonal transport in motor neurons causing late-onset progressive degeneration. *Neuron* **34**, 715-27.
- Landar, A., Caddell, G., Chessher, J. and Zimmer, D. B.** (1996). Identification of an S100A1/S100B target protein: phosphoglucomutase. *Cell Calcium* **20**, 279-85.
- Landar, A., Hall, T. L., Cornwall, E. H., Correia, J. J., Drohat, A. C., Weber, D. J. and Zimmer, D. B.** (1997). The role of cysteine residues in S100B dimerization and regulation of target protein activity. *Biochim Biophys Acta* **1343**, 117-29.
- Landolfi, B., Curci, S., Debellis, L., Pozzan, T. and Hofer, A. M.** (1998). Ca²⁺ homeostasis in the agonist-sensitive internal store: functional interactions between mitochondria and the ER measured In situ in intact cells. *J Cell Biol* **142**, 1235-43.
- Landry, C. F., Ivy, G. O., Dunn, R. J., Marks, A. and Brown, I. R.** (1989). Expression of the gene encoding the beta-subunit of S-100 protein in the developing rat brain analyzed by in situ hybridization. *Brain Res Mol Brain Res* **6**, 251-62.
- Landry, C. F., Youson, J. H. and Brown, I. R.** (1990). Expression of the beta-S100 gene in brain and craniofacial cartilage of the embryonic rat. *Dev Neurosci* **12**, 225-34.
- Lawrie, A. M., Rizzuto, R., Pozzan, T. and Simpson, A. W.** (1996). A role for calcium influx in the regulation of mitochondrial calcium in endothelial cells. *J Biol Chem* **271**, 10753-9.
- Leal, R. B., Frizzo, J. K., Tramontina, F., Fieuw-Makaroff, S., Bobrovskaya, L., Dunkley, P. R. and Goncalves, C. A.** (2004). S100B protein stimulates calcineurin activity. *Neuroreport* **15**, 317-20.
- Lee, C. W. and Peng, H. B.** (2006). Mitochondrial clustering at the vertebrate neuromuscular junction during presynaptic differentiation. *J Neurobiol* **66**, 522-36.
- Lee, Y. C., Volk, D. E., Thiviyathan, V., Kleerekoper, Q., Gribenko, A. V., Zhang, S., Gorenstein, D. G., Makhatadze, G. I. and Luxon, B. A.** (2004a). NMR structure of the Apo-S100P protein. *J Biomol NMR* **29**, 399-402.
- Lee, Y. J., Jeong, S. Y., Karbowski, M., Smith, C. L. and Youle, R. J.** (2004b). Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opal in apoptosis. *Mol Biol Cell* **15**, 5001-11.
- Lefranc, F., Decaestecker, C., Brotchi, J., Heizmann, C. W., Dewitte, O., Kiss, R. and Mijatovic, T.** (2005). Co-expression/co-location of S100 proteins (S100B, S100A1 and S100A2) and protein kinase C (PKC-beta, -eta and -zeta) in a rat model of cerebral basilar artery vasospasm. *Neuropathol Appl Neurobiol* **31**, 649-60.
- Legros, F., Lombes, A., Frachon, P. and Rojo, M.** (2002). Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol Biol Cell* **13**, 4343-54.
- Lemasters, J. J., Qian, T., Elmore, S. P., Trost, L. C., Nishimura, Y., Herman, B., Bradham, C. A., Brenner, D. A. and Nieminen, A. L.** (1998). Confocal microscopy of the mitochondrial permeability transition in necrotic cell killing, apoptosis and autophagy. *Biofactors* **8**, 283-5.
- Lenzen, C. U., Steinmann, D., Whiteheart, S. W. and Weis, W. I.** (1998). Crystal structure of the hexamerization domain of N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein. *Cell* **94**, 525-36.
- Leopold, P. L., McDowall, A. W., Pfister, K. K., Bloom, G. S. and Brady, S. T.** (1992). Association of kinesin with characterized membrane-bounded organelles. *Cell Motil Cytoskeleton* **23**, 19-33.
- Levy, R., Shohat, L. and Solomon, B.** (1998). Specificity of an anti-aluminium monoclonal antibody toward free and protein-bound aluminium. *J Inorg Biochem* **69**, 159-63.
- Lewin, T. M., Kim, J. H., Granger, D. A., Vance, J. E. and Coleman, R. A.** (2001). Acyl-CoA synthetase isoforms 1, 4, and 5 are present in different subcellular membranes in rat liver and can be inhibited independently. *J Biol Chem* **276**, 24674-9.
- Li, Z., Okamoto, K., Hayashi, Y. and Sheng, M.** (2004). The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell* **119**, 873-87.

- Ligon, L. A. and Steward, O.** (2000a). Movement of mitochondria in the axons and dendrites of cultured hippocampal neurons. *J Comp Neurol* **427**, 340-50.
- Ligon, L. A. and Steward, O.** (2000b). Role of microtubules and actin filaments in the movement of mitochondria in the axons and dendrites of cultured hippocampal neurons. *J Comp Neurol* **427**, 351-61.
- Lin, J., Blake, M., Tang, C., Zimmer, D., Rustandi, R. R., Weber, D. J. and Carrier, F.** (2001). Inhibition of p53 transcriptional activity by the S100B calcium-binding protein. *J Biol Chem* **276**, 35037-41.
- Lin, J., Yang, Q., Yan, Z., Markowitz, J., Wilder, P. T., Carrier, F. and Weber, D. J.** (2004). Inhibiting S100B restores p53 levels in primary malignant melanoma cancer cells. *J Biol Chem* **279**, 34071-7.
- Lin, L. H., Van Eldik, L. J., Osheroff, N. and Norden, J. J.** (1994). Inhibition of protein kinase C- and casein kinase II-mediated phosphorylation of GAP-43 by S100 beta. *Brain Res Mol Brain Res* **25**, 297-304.
- Lodi, R., Tonon, C., Valentino, M. L., Iotti, S., Clementi, V., Malucelli, E., Barboni, P., Longanesi, L., Schimpf, S., Wissinger, B. et al.** (2004). Deficit of in vivo mitochondrial ATP production in OPA1-related dominant optic atrophy. *Ann Neurol* **56**, 719-23.
- Loeper, S., Romeike, B. F., Heckmann, N., Jung, V., Henn, W., Feiden, W., Zang, K. D. and Urbchat, S.** (2001). Frequent mitotic errors in tumor cells of genetically micro-heterogeneous glioblastomas. *Cytogenet Cell Genet* **94**, 1-8.
- Lonergan, T., Brenner, C. and Bavister, B.** (2006). Differentiation-related changes in mitochondrial properties as indicators of stem cell competence. *J Cell Physiol* **208**, 149-53.
- Lopez, M. F., Kristal, B. S., Chernokalskaya, E., Lazarev, A., Shestopalov, A. I., Bogdanova, A. and Robinson, M.** (2000). High-throughput profiling of the mitochondrial proteome using affinity fractionation and automation. *Electrophoresis* **21**, 3427-40.
- Lu, H., Allen, S., Wardleworth, L., Savory, P. and Tokatlidis, K.** (2004). Functional TIM10 chaperone assembly is redox-regulated in vivo. *J Biol Chem* **279**, 18952-8.
- Lu, Q. R., Park, J. K., Noll, E., Chan, J. A., Alberta, J., Yuk, D., Alzamora, M. G., Louis, D. N., Stiles, C. D., Rowitch, D. H. et al.** (2001). Oligodendrocyte lineage genes (OLIG) as molecular markers for human glial brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10851-6.
- Lupas, A. N. and Martin, J.** (2002). AAA proteins. *Curr Opin Struct Biol* **12**, 746-53.
- Ma, T. S., Mann, D. L., Lee, J. H. and Gallinghouse, G. J.** (1999). SR compartment calcium and cell apoptosis in SERCA overexpression. *Cell Calcium* **26**, 25-36.
- Maarse, A. C., Blom, J., Keil, P., Pfanner, N. and Meijer, M.** (1994). Identification of the essential yeast protein MIM17, an integral mitochondrial inner membrane protein involved in protein import. *FEBS Lett* **349**, 215-21.
- Maechler, P., Kennedy, E. D., Sebo, E., Valeva, A., Pozzan, T. and Wollheim, C. B.** (1999). Secretagogues modulate the calcium concentration in the endoplasmic reticulum of insulin-secreting cells. Studies in aequorin-expressing intact and permeabilized ins-1 cells. *J Biol Chem* **274**, 12583-92.
- Maechler, P., Kennedy, E. D., Wang, H. and Wollheim, C. B.** (1998). Desensitization of mitochondrial Ca²⁺ and insulin secretion responses in the beta cell. *J Biol Chem* **273**, 20770-8.
- Maeda, T., Usui, H., Araki, K., Kuwano, R., Takahashi, Y. and Suzuki, Y.** (1991). Structure and expression of rat S-100 beta subunit gene. *Brain Res Mol Brain Res* **10**, 193-202.
- Maler, L., Potts, B. C. and Chazin, W. J.** (1999). High resolution solution structure of apo calyculin and structural variations in the S100 family of calcium-binding proteins. *J Biomol NMR* **13**, 233-47.
- Maler, L., Sastry, M. and Chazin, W. J.** (2002). A structural basis for S100 protein specificity derived from comparative analysis of apo and Ca(2+)-calyculin. *J Mol Biol* **317**, 279-90.
- Mannella, C. A.** (2000). Introduction: our changing views of mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* **32**, 1-4.
- Mannella, C. A., Buttle, K., Rath, B. K. and Marko, M.** (1998). Electron microscopic tomography of rat-liver mitochondria and their interaction with the endoplasmic reticulum. *Biofactors* **8**, 225-8.
- Marc, P., Margeot, A., Devaux, F., Blugeon, C., Corral-Debrinski, M. and Jacq, C.** (2002). Genome-wide analysis of mRNAs targeted to yeast mitochondria. *EMBO Rep* **3**, 159-64.
- Marenholz, I., Heizmann, C. W. and Fritz, G.** (2004). S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem Biophys Res Commun* **322**, 1111-22.
- Margeot, A., Garcia, M., Wang, W., Tetaud, E., di Rago, J. P. and Jacq, C.** (2005). Why are many mRNAs translated to the vicinity of mitochondria: a role in protein complex assembly? *Gene* **354**, 64-71.
- Margineantu, D. H., Gregory Cox, W., Sundell, L., Sherwood, S. W., Beechem, J. M. and Capaldi, R. A.** (2002). Cell cycle dependent morphology changes and associated mitochondrial DNA redistribution in mitochondria of human cell lines. *Mitochondrion* **1**, 425-35.
- Margulis, A., Pozdnyakov, N. and Sitaramayya, A.** (1996). Activation of bovine photoreceptor guanylate cyclase by S100 proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **218**, 243-7.

- Mariggio, M. A., Fulle, S., Calissano, P., Nicoletti, I. and Fano, G.** (1994). The brain protein S-100ab induces apoptosis in PC12 cells. *Neuroscience* **60**, 29-35.
- Markowitz, J., Chen, I., Gitti, R., Baldissari, D. M., Pan, Y., Udan, R., Carrier, F., MacKerell, A. D., Jr. and Weber, D. J.** (2004). Identification and characterization of small molecule inhibitors of the calcium-dependent S100B-p53 tumor suppressor interaction. *J Med Chem* **47**, 5085-93.
- Markowitz, J., Rustandi, R. R., Varney, K. M., Wilder, P. T., Udan, R., Wu, S. L., Horrocks, W. D. and Weber, D. J.** (2005). Calcium-binding properties of wild-type and EF-hand mutants of S100B in the presence and absence of a peptide derived from the C-terminal negative regulatory domain of p53. *Biochemistry* **44**, 7305-14.
- Marshak, D. R. and Pena, L. A.** (1992). Potential role of S100 beta in Alzheimer's disease: an hypothesis involving mitotic protein kinases. *Prog Clin Biol Res* **379**, 289-307.
- Marshak, D. R., Pesce, S. A., Stanley, L. C. and Griffin, W. S.** (1992). Increased S100 beta neurotrophic activity in Alzheimer's disease temporal lobe. *Neurobiol Aging* **13**, 1-7.
- Marsili, V., Mancinelli, L., Menchetti, G., Fulle, S., Baldoni, F. and Fano, G.** (1992). S-100ab increases Ca²⁺ release in purified sarcoplasmic reticulum vesicles of frog skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil* **13**, 511-5.
- Martin, M., Iyadurai, S. J., Gassman, A., Gindhart, J. G., Jr., Hays, T. S. and Saxton, W. M.** (1999). Cytoplasmic dynein, the dynactin complex, and kinesin are interdependent and essential for fast axonal transport. *Mol Biol Cell* **10**, 3717-28.
- Matsumura, H., Shiba, T., Inoue, T., Harada, S. and Kai, Y.** (1998). A novel mode of target recognition suggested by the 2.0 Å structure of holo S100B from bovine brain. *Structure* **6**, 233-41.
- Mbele, G. O., Deloulme, J. C., Gentil, B. J., Delphin, C., Ferro, M., Garin, J., Takahashi, M. and Baudier, J.** (2002). The zinc- and calcium-binding S100B interacts and co-localizes with IQGAP1 during dynamic rearrangement of cell membranes. *J Biol Chem* **277**, 49998-50007.
- McAdory, B. S., Van Eldik, L. J. and Norden, J. J.** (1998). S100B, a neurotropic protein that modulates neuronal protein phosphorylation, is upregulated during lesion-induced collateral sprouting and reactive synaptogenesis. *Brain Res* **813**, 211-7.
- McClintock, K. A. and Shaw, G. S.** (2000). A logical sequence search for S100B target proteins. *Protein Sci* **9**, 2043-6.
- McClintock, K. A. and Shaw, G. S.** (2002). Assignment of 1H, 13C and 15N resonances of human Ca²⁺-S100B in complex with the TRTK-12 peptide. *J Biomol NMR* **23**, 255-6.
- McClintock, K. A. and Shaw, G. S.** (2003). A novel S100 target conformation is revealed by the solution structure of the Ca²⁺-S100B-TRTK-12 complex. *J Biol Chem* **278**, 6251-7.
- McClintock, K. A., Van Eldik, L. J. and Shaw, G. S.** (2002). The C-terminus and linker region of S100B exert dual control on protein-protein interactions with TRTK-12. *Biochemistry* **41**, 5421-8.
- McCormack, J. G., Halestrap, A. P. and Denton, R. M.** (1990). Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiol Rev* **70**, 391-425.
- McDonald, J. M., See, S. J., Tremont, I. W., Colman, H., Gilbert, M. R., Groves, M., Burger, P. C., Louis, D. N., Giannini, C., Fuller, G. et al.** (2005). The prognostic impact of histology and 1p/19q status in anaplastic oligodendroglial tumors. *Cancer* **104**, 1468-77.
- Mello e Souza, T., Rohden, A., Meinhardt, M., Goncalves, C. A. and Quillfeldt, J. A.** (2000). S100B infusion into the rat hippocampus facilitates memory for the inhibitory avoidance task but not for the open-field habituation. *Physiol Behav* **71**, 29-33.
- Melzer, P., Zhang, M. Z. and McKanna, J. A.** (1997). Infraorbital nerve transection and whisker follicle removal in adult rats affect microglia and astrocytes in the trigeminal brainstem. A study with lipocortin1- and S100beta-immunohistochemistry. *Neuroscience* **80**, 459-72.
- Merlo, A., Herman, J. G., Mao, L., Lee, D. J., Gabrielson, E., Burger, P. C., Baylin, S. B. and Sidransky, D.** (1995). 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med* **1**, 686-92.
- Mesecke, N., Terziyska, N., Kozany, C., Baumann, F., Neupert, W., Hell, K. and Herrmann, J. M.** (2005). A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. *Cell* **121**, 1059-69.
- Mignery, G. A., Sudhof, T. C., Takei, K. and De Camilli, P.** (1989). Putative receptor for inositol 1,4,5-trisphosphate similar to ryanodine receptor. *Nature* **342**, 192-5.
- Miller, K. E. and Sheetz, M. P.** (2004). Axonal mitochondrial transport and potential are correlated. *J Cell Sci* **117**, 2791-804.
- Miller, M. A. and Kent, C.** (1986). Characterization of the pathways for phosphatidylethanolamine biosynthesis in Chinese hamster ovary mutant and parental cell lines. *J Biol Chem* **261**, 9753-61.
- Millward, T. A., Heizmann, C. W., Schafer, B. W. and Hemmings, B. A.** (1998). Calcium regulation of Ndr protein kinase mediated by S100 calcium-binding proteins. *Embo J* **17**, 5913-22.

- Minin, A. A., Kulik, A. V., Gyoeva, F. K., Li, Y., Goshima, G. and Gelfand, V. I.** (2006). Regulation of mitochondria distribution by RhoA and formins. *J Cell Sci* **119**, 659-70.
- Mischel, P. S., Cloughesy, T. F. and Nelson, S. F.** (2004). DNA-microarray analysis of brain cancer: molecular classification for therapy. *Nat Rev Neurosci* **5**, 782-92.
- Misra, A., Chattopadhyay, P., Dinda, A. K., Sarkar, C., Mahapatra, A. K., Hasnain, S. E. and Sinha, S.** (2000). Extensive intra-tumor heterogeneity in primary human glial tumors as a result of locus non-specific genomic alterations. *J Neurooncol* **48**, 1-12.
- Mittl, P. R., Fritz, G., Sargent, D. F., Richmond, T. J., Heizmann, C. W. and Grutter, M. G.** (2002). Metal-free MIRAS phasing: structure of apo-S100A3. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**, 1255-61.
- Mogk, A. and Bukau, B.** (2004). Molecular chaperones: structure of a protein disaggregase. *Curr Biol* **14**, R78-80.
- Montero, M., Alonso, M. T., Carnicero, E., Cuchillo-Ibanez, I., Albillos, A., Garcia, A. G., Garcia-Sancho, J. and Alvarez, J.** (2000). Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca²⁺ transients that modulate secretion. *Nat Cell Biol* **2**, 57-61.
- Moore, B. W.** (1965). A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* **19**, 739-44.
- Moore, B. W. and McGregor, D.** (1965). Chromatographic and Electrophoretic Fractionation of Soluble Proteins of Brain and Liver. *J Biol Chem* **240**, 1647-53.
- Mootha, V. K., Bunkenborg, J., Olsen, J. V., Hjerrild, M., Wisniewski, J. R., Stahl, E., Bolouri, M. S., Ray, H. N., Sihag, S., Kamal, M. et al.** (2003). Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria. *Cell* **115**, 629-40.
- Moroz, O. V., Antson, A. A., Murshudov, G. N., Maitland, N. J., Dodson, G. G., Wilson, K. S., Skibshoj, I., Lukanidin, E. M. and Bronstein, I. B.** (2001). The three-dimensional structure of human S100A12. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **57**, 20-9.
- Morris, R. L. and Hollenbeck, P. J.** (1993). The regulation of bidirectional mitochondrial transport is coordinated with axonal outgrowth. *J Cell Sci* **104** (Pt 3), 917-27.
- Morris, R. L. and Hollenbeck, P. J.** (1995). Axonal transport of mitochondria along microtubules and F-actin in living vertebrate neurons. *J Cell Biol* **131**, 1315-26.
- Morrison, C., Henzing, A. J., Jensen, O. N., Osheroff, N., Dodson, H., Kandels-Lewis, S. E., Adams, R. R. and Earnshaw, W. C.** (2002). Proteomic analysis of human metaphase chromosomes reveals topoisomerase II alpha as an Aurora B substrate. *Nucleic Acids Res* **30**, 5318-27.
- Mrak, R. E. and Griffin, W. S.** (2001). The role of activated astrocytes and of the neurotrophic cytokine S100B in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **22**, 915-22.
- Mrak, R. E., Sheng, J. G. and Griffin, W. S.** (1996). Correlation of astrocytic S100 beta expression with dystrophic neurites in amyloid plaques of Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **55**, 273-9.
- Mueller, A., Schafer, B. W., Ferrari, S., Weibel, M., Makek, M., Hochli, M. and Heizmann, C. W.** (2005). The calcium-binding protein S100A2 interacts with p53 and modulates its transcriptional activity. *J Biol Chem* **280**, 29186-93.
- Mukasa, A., Ueki, K., Matsumoto, S., Tsutsumi, S., Nishikawa, R., Fujimaki, T., Asai, A., Kirino, T. and Aburatani, H.** (2002). Distinction in gene expression profiles of oligodendrogliomas with and without allelic loss of 1p. *Oncogene* **21**, 3961-8.
- Muriel, M. P., Lambeng, N., Darios, F., Michel, P. P., Hirsch, E. C., Agid, Y. and Ruberg, M.** (2000). Mitochondrial free calcium levels (Rhod-2 fluorescence) and ultrastructural alterations in neuronally differentiated PC12 cells during ceramide-dependent cell death. *J Comp Neurol* **426**, 297-315.
- Mutsaers, S. E. and Carroll, W. M.** (1998). Focal accumulation of intra-axonal mitochondria in demyelination of the cat optic nerve. *Acta Neuropathol (Berl)* **96**, 139-43.
- Nakada, K., Inoue, K., Ono, T., Isobe, K., Ogura, A., Goto, Y. I., Nonaka, I. and Hayashi, J. I.** (2001). Inter-mitochondrial complementation: Mitochondria-specific system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA. *Nat Med* **7**, 934-40.
- Nakamura, K., Bossy-Wetzel, E., Burns, K., Fadel, M. P., Lozyk, M., Goping, I. S., Opas, M., Bleackley, R. C., Green, D. R. and Michalak, M.** (2000). Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis. *J Cell Biol* **150**, 731-40.
- Nangaku, M., Sato-Yoshitake, R., Okada, Y., Noda, Y., Takemura, R., Yamazaki, H. and Hirokawa, N.** (1994). KIF1B, a novel microtubule plus end-directed monomeric motor protein for transport of mitochondria. *Cell* **79**, 1209-20.
- Naoe, M., Ohwa, Y., Ishikawa, D., Ohshima, C., Nishikawa, S., Yamamoto, H. and Endo, T.** (2004). Identification of Tim40 that mediates protein sorting to the mitochondrial intermembrane space. *J Biol Chem* **279**, 47815-21.
- Neher, E.** (1998). Usefulness and limitations of linear approximations to the understanding of Ca⁺⁺ signals. *Cell Calcium* **24**, 345-57.

- Neuspiel, M., Zunino, R., Gangaraju, S., Rippstein, P. and McBride, H.** (2005). Activated mitofusin 2 signals mitochondrial fusion, interferes with Bax activation, and reduces susceptibility to radical induced depolarization. *J Biol Chem* **280**, 25060-70.
- Nguyen, P. V., Marin, L. and Atwood, H. L.** (1997). Synaptic physiology and mitochondrial function in crayfish tonic and phasic motor neurons. *J Neurophysiol* **78**, 281-94.
- Nie, F. and Wong-Riley, M. T.** (1996a). Metabolic and neurochemical plasticity of gamma-aminobutyric acid-immunoreactive neurons in the adult macaque striate cortex following monocular impulse blockade: quantitative electron microscopic analysis. *J Comp Neurol* **370**, 350-66.
- Nie, F. and Wong-Riley, M. T.** (1996b). Mitochondrial- and nuclear-encoded subunits of cytochrome oxidase in neurons: differences in compartmental distribution, correlation with enzyme activity, and regulation by neuronal activity. *J Comp Neurol* **373**, 139-55.
- Niemann, A., Ruegg, M., La Padula, V., Schenone, A. and Suter, U.** (2005). Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *J Cell Biol* **170**, 1067-78.
- Nishikawa, T., Lee, I. S., Shiraiishi, N., Ishikawa, T., Ohta, Y. and Nishikimi, M.** (1997). Identification of S100b protein as copper-binding protein and its suppression of copper-induced cell damage. *J Biol Chem* **272**, 23037-41.
- Nishiyama, H., Knopfel, T., Endo, S. and Itohara, S.** (2002). Glial protein S100B modulates long-term neuronal synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 4037-42.
- Nunnari, J., Marshall, W. F., Straight, A., Murray, A., Sedat, J. W. and Walter, P.** (1997). Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Mol Biol Cell* **8**, 1233-42.
- Nutt, C. L., Mani, D. R., Betensky, R. A., Tamayo, P., Cairncross, J. G., Ladd, C., Pohl, U., Hartmann, C., McLaughlin, M. E., Batchelor, T. T. et al.** (2003). Gene expression-based classification of malignant gliomas correlates better with survival than histological classification. *Cancer Res* **63**, 1602-7.
- O'Dowd, B. S., Zhao, W. Q., Ng, K. T. and Robinson, S. R.** (1997). Chicks injected with antisera to either S-100 alpha or S-100 beta protein develop amnesia for a passive avoidance task. *Neurobiol Learn Mem* **67**, 197-206.
- Odink, K., Cerletti, N., Bruggen, J., Clerc, R. G., Tarcsay, L., Zwadlo, G., Gerhards, G., Schlegel, R. and Sorg, C.** (1987). Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis. *Nature* **330**, 80-2.
- Ohgaki, H., Dessen, P., Jourde, B., Horstmann, S., Nishikawa, T., Di Patre, P. L., Burkhard, C., Schuler, D., Probst-Hensch, N. M., Maiorka, P. C. et al.** (2004). Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* **64**, 6892-9.
- Ohgaki, H. and Kleihues, P.** (2005). Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* **64**, 479-89.
- Otterbein, L. R., Kordowska, J., Witte-Hoffmann, C., Wang, C. L. and Dominguez, R.** (2002). Crystal structures of S100A6 in the Ca(2+)-free and Ca(2+)-bound states: the calcium sensor mechanism of S100 proteins revealed at atomic resolution. *Structure* **10**, 557-67.
- Overly, C. C., Rieff, H. I. and Hollenbeck, P. J.** (1996). Organelle motility and metabolism in axons vs dendrites of cultured hippocampal neurons. *J Cell Sci* **109** (Pt 5), 971-80.
- Pagliarini, D. J., Wiley, S. E., Kimple, M. E., Dixon, J. R., Kelly, P., Worby, C. A., Casey, P. J. and Dixon, J. E.** (2005). Involvement of a mitochondrial phosphatase in the regulation of ATP production and insulin secretion in pancreatic beta cells. *Mol Cell* **19**, 197-207.
- Palay, S. L.** (1956). Synapses in the central nervous system. *J Biophys Biochem Cytol* **2**, 193-202.
- Park, H. R. and Min, S. K.** (2003). Expression of S100A2 and S100B proteins in epithelial tumors of the skin. *J Cutan Pathol* **30**, 373-8.
- Park, M. K., Ashby, M. C., Erdemli, G., Petersen, O. H. and Tepikin, A. V.** (2001). Perinuclear, perigranular and sub-plasmalemmal mitochondria have distinct functions in the regulation of cellular calcium transport. *Embo J* **20**, 1863-74.
- Parker, T. G., Marks, A. and Tsoporis, J. N.** (1998). Induction of S100b in myocardium: an intrinsic inhibitor of cardiac hypertrophy. *Can J Appl Physiol* **23**, 377-89.
- Paulin, D., Huet, A., Khanamirian, L. and Xue, Z.** (2004). Desminopathies in muscle disease. *J Pathol* **204**, 418-27.
- Peng, Y. Y. and Wang, K. S.** (2000). A four-compartment model for Ca²⁺ dynamics: an interpretation of Ca²⁺ decay after repetitive firing of intact nerve terminals. *J Comput Neurosci* **8**, 275-98.
- Percy, A. K., Moore, J. F., Carson, M. A. and Waechter, C. J.** (1983). Characterization of brain phosphatidylserine decarboxylase: localization in the mitochondrial inner membrane. *Arch Biochem Biophys* **223**, 484-94.

- Pereira, A. J., Dalby, B., Stewart, R. J., Doxsey, S. J. and Goldstein, L. S.** (1997). Mitochondrial association of a plus end-directed microtubule motor expressed during mitosis in *Drosophila*. *J Cell Biol* **136**, 1081-90.
- Perez-Martin, M., Grondona, J. M., Cifuentes, M., Perez-Figares, J. M., Jimenez, J. A. and Fernandez-Llebrez, P.** (2000). Ependymal explants from the lateral ventricle of the adult bovine brain: a model system for morphological and functional studies of the ependyma. *Cell Tissue Res* **300**, 11-9.
- Perez-Olle, R., Lopez-Toledano, M. A., Goryunov, D., Cabrera-Poch, N., Stefanis, L., Brown, K. and Liem, R. K.** (2005). Mutations in the neurofilament light gene linked to Charcot-Marie-Tooth disease cause defects in transport. *J Neurochem* **93**, 861-74.
- Perry, J. R.** (2001). Oligodendrogliomas: clinical and genetic correlations. *Curr Opin Neurol* **14**, 705-10.
- Perry, J. R., Louis, D. N. and Cairncross, J. G.** (1999). Current treatment of oligodendrogliomas. *Arch Neurol* **56**, 434-6.
- Petit, P. X., Goubern, M., Diolez, P., Susin, S. A., Zamzami, N. and Kroemer, G.** (1998). Disruption of the outer mitochondrial membrane as a result of large amplitude swelling: the impact of irreversible permeability transition. *FEBS Lett* **426**, 111-6.
- Petronilli, V., Nicolli, A., Costantini, P., Colonna, R. and Bernardi, P.** (1994). Regulation of the permeability transition pore, a voltage-dependent mitochondrial channel inhibited by cyclosporin A. *Biochim Biophys Acta* **1187**, 255-9.
- Pezzati, R., Bossi, M., Podini, P., Meldolesi, J. and Grohovaz, F.** (1997). High-resolution calcium mapping of the endoplasmic reticulum-Golgi-exocytic membrane system. Electron energy loss imaging analysis of quick frozen-freeze dried PC12 cells. *Mol Biol Cell* **8**, 1501-12.
- Piano, F., Schetter, A. J., Morton, D. G., Gunsalus, K. C., Reinke, V., Kim, S. K. and Kempthues, K. J.** (2002). Gene clustering based on RNAi phenotypes of ovary-enriched genes in *C. elegans*. *Curr Biol* **12**, 1959-64.
- Pickett, C. B., Montisano, D., Eisner, D. and Cascarano, J.** (1980). The physical association between rat liver mitochondria and rough endoplasmic reticulum. I. Isolation, electron microscopic examination and sedimentation equilibrium centrifugation analyses of rough endoplasmic reticulum-mitochondrial complexes. *Exp Cell Res* **128**, 343-52.
- Pilling, A. D., Horiuchi, D., Lively, C. M. and Saxton, W. M.** (2006). Kinesin-1 and Dynein are the primary motors for fast transport of mitochondria in *Drosophila* motor axons. *Mol Biol Cell* **17**, 2057-68.
- Pinton, P., Ferrari, D., Magalhaes, P., Schulze-Osthoff, K., Di Virgilio, F., Pozzan, T. and Rizzuto, R.** (2000). Reduced loading of intracellular Ca(2+) stores and downregulation of capacitative Ca(2+) influx in Bcl-2-overexpressing cells. *J Cell Biol* **148**, 857-62.
- Pinton, P., Ferrari, D., Rapizzi, E., Di Virgilio, F., Pozzan, T. and Rizzuto, R.** (2001). The Ca2+ concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action. *Embo J* **20**, 2690-701.
- Pivovarova, N. B., Hongpaisan, J., Andrews, S. B. and Friel, D. D.** (1999). Depolarization-induced mitochondrial Ca accumulation in sympathetic neurons: spatial and temporal characteristics. *J Neurosci* **19**, 6372-84.
- Polyakov, A. A., Huber, P. A., Marston, S. B. and Gusev, N. B.** (1998). Interaction of isoforms of S100 protein with smooth muscle caldesmon. *FEBS Lett* **422**, 235-9.
- Potts, B. C., Smith, J., Akke, M., Macke, T. J., Okazaki, K., Hidaka, H., Case, D. A. and Chazin, W. J.** (1995). The structure of calyculin reveals a novel homodimeric fold for S100 Ca(2+)-binding proteins. *Nat Struct Biol* **2**, 790-6.
- Povlishock, J. T.** (1976). The fine structure of the axons and growth cones of the human fetal cerebral cortex. *Brain Res* **114**, 379-9i.
- Pozdnyakov, N., Goracznik, R., Margulis, A., Duda, T., Sharma, R. K., Yoshida, A. and Sitaramayya, A.** (1997). Structural and functional characterization of retinal calcium-dependent guanylate cyclase activator protein (CD-GCAP): identity with S100beta protein. *Biochemistry* **36**, 14159-66.
- Pozdnyakov, N., Margulis, A. and Sitaramayya, A.** (1998). Identification of effector binding sites on S100 beta: studies with guanylate cyclase and p80, a retinal phosphoprotein. *Biochemistry* **37**, 10701-8.
- Pralong, W. F., Spat, A. and Wollheim, C. B.** (1994). Dynamic pacing of cell metabolism by intracellular Ca2+ transients. *J Biol Chem* **269**, 27310-4.
- Pritchard, K. and Marston, S. B.** (1991). Ca(2+)-dependent regulation of vascular smooth-muscle caldesmon by S.100 and related smooth-muscle proteins. *Biochem J* **277** (Pt 3), 819-24.
- Qiang, L., Yu, W., Andreadis, A., Luo, M. and Baas, P. W.** (2006). Tau protects microtubules in the axon from severing by katanin. *J Neurosci* **26**, 3120-9.
- Rabilloud, T., Kieffer, S., Procaccio, V., Louwagie, M., Courchesne, P. L., Patterson, S. D., Martinez, P., Garin, J. and Lunardi, J.** (1998). Two-dimensional electrophoresis of human placental

mitochondria and protein identification by mass spectrometry: toward a human mitochondrial proteome. *Electrophoresis* **19**, 1006-14.

Rambotti, M. G., Giambanco, I., Spreca, A. and Donato, R. (1999). S100B and S100A1 proteins in bovine retina: their calcium-dependent stimulation of a membrane-bound guanylate cyclase activity as investigated by ultracytochemistry. *Neuroscience* **92**, 1089-101.

Rammes, A., Roth, J., Goebeler, M., Klempt, M., Hartmann, M. and Sorg, C. (1997). Myeloid-related protein (MRP) 8 and MRP14, calcium-binding proteins of the S100 family, are secreted by activated monocytes via a novel, tubulin-dependent pathway. *J Biol Chem* **272**, 9496-502.

Rao, R. D. and James, C. D. (2004). Altered molecular pathways in gliomas: an overview of clinically relevant issues. *Semin Oncol* **31**, 595-604.

Rapaport, D., Brunner, M., Neupert, W. and Westermann, B. (1998). Fzo1p is a mitochondrial outer membrane protein essential for the biogenesis of functional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **273**, 20150-5.

Rapizzi, E., Pinton, P., Szabadkai, G., Wieckowski, M. R., Vandecasteele, G., Baird, G., Tuft, R. A., Fogarty, K. E. and Rizzuto, R. (2002). Recombinant expression of the voltage-dependent anion channel enhances the transfer of Ca²⁺ microdomains to mitochondria. *J Cell Biol* **159**, 613-24.

Rebardo, R., Melani, R., Balestrino, M., Cupello, A., Haglid, K. and Hyden, H. (2000). Antiserum against S-100 protein prevents long term potentiation through a cAMP-related mechanism. *Neurochem Res* **25**, 541-5.

Reddy, M. A., Li, S. L., Sahar, S., Kim, Y. S., Xu, Z. G., Lanting, L. and Natarajan, R. (2006). Key role of Src kinase in S100B-induced activation of the receptor for advanced glycation end products in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **281**, 13685-93.

Reeves, R. H., Yao, J., Crowley, M. R., Buck, S., Zhang, X., Yarowsky, P., Gearhart, J. D. and Hilt, D. C. (1994). Astrocytosis and axonal proliferation in the hippocampus of S100b transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 5359-63.

Rehling, P., Brandner, K. and Pfanner, N. (2004). Mitochondrial import and the twin-pore translocase. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 519-30.

Reifenberger, J., Reifenberger, G., Liu, L., James, C. D., Wechsler, W. and Collins, V. P. (1994). Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p. *Am J Pathol* **145**, 1175-90.

Rety, S., Osterloh, D., Arie, J. P., Tabaries, S., Seeman, J., Russo-Marie, F., Gerke, V. and Lewit-Bentley, A. (2000). Structural basis of the Ca(2+)-dependent association between S100C (S100A11) and its target, the N-terminal part of annexin I. *Structure* **8**, 175-84.

Rety, S., Sopkova, J., Renouard, M., Osterloh, D., Gerke, V., Tabaries, S., Russo-Marie, F. and Lewit-Bentley, A. (1999). The crystal structure of a complex of p11 with the annexin II N-terminal peptide. *Nat Struct Biol* **6**, 89-95.

Rickmann, M. and Wolff, J. R. (1995a). S100 immunoreactivity in a subpopulation of oligodendrocytes and Ranvier's nodes of adult rat brain. *Neurosci Lett* **186**, 13-6.

Rickmann, M. and Wolff, J. R. (1995b). S100 protein expression in subpopulations of neurons of rat brain. *Neuroscience* **67**, 977-91.

Ridley, A. J., Paterson, H. F., Noble, M. and Land, H. (1988). Ras-mediated cell cycle arrest is altered by nuclear oncogenes to induce Schwann cell transformation. *Embo J* **7**, 1635-45.

Rintoul, G. L., Bennett, V. J., Papaconstantinou, N. A. and Reynolds, I. J. (2006). Nitric oxide inhibits mitochondrial movement in forebrain neurons associated with disruption of mitochondrial membrane potential. *J Neurochem* **97**, 800-6.

Rintoul, G. L., Filiano, A. J., Brocard, J. B., Kress, G. J. and Reynolds, I. J. (2003). Glutamate decreases mitochondrial size and movement in primary forebrain neurons. *J Neurosci* **23**, 7881-8.

Rissler, M., Wiedemann, N., Pfannschmidt, S., Gabriel, K., Guiard, B., Pfanner, N. and Chacinska, A. (2005). The essential mitochondrial protein Erv1 cooperates with Mia40 in biogenesis of intermembrane space proteins. *J Mol Biol* **353**, 485-92.

Riuzzi F., S. G., Donato R. (2006). Complex regulatory effect of extracellular S100B on myoblast differentiation: S100B activates quiescent myoblast and satellite cells. In *9th meeting of the european calcium society*.

Rizzuto, R., Bastianutto, C., Brini, M., Murgia, M. and Pozzan, T. (1994). Mitochondrial Ca²⁺ homeostasis in intact cells. *J Cell Biol* **126**, 1183-94.

Rizzuto, R., Brini, M., Murgia, M. and Pozzan, T. (1993). Microdomains with high Ca²⁺ close to IP₃-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science* **262**, 744-7.

Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F. S., Fogarty, K. E., Lifshitz, L. M., Tuft, R. A. and Pozzan, T. (1998). Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science* **280**, 1763-6.

- Rizzuto, R. and Pozzan, T.** (2006). Microdomains of intracellular Ca²⁺: molecular determinants and functional consequences. *Physiol Rev* **86**, 369-408.
- Rizzuto, R., Simpson, A. W., Brini, M. and Pozzan, T.** (1992). Rapid changes of mitochondrial Ca²⁺ revealed by specifically targeted recombinant aequorin. *Nature* **358**, 325-7.
- Robb-Gaspers, L. D., Burnett, P., Rutter, G. A., Denton, R. M., Rizzuto, R. and Thomas, A. P.** (1998). Integrating cytosolic calcium signals into mitochondrial metabolic responses. *Embo J* **17**, 4987-5000.
- Robert, V., Gurlini, P., Tosello, V., Nagai, T., Miyawaki, A., Di Lisa, F. and Pozzan, T.** (2001). Beat-to-beat oscillations of mitochondrial [Ca²⁺] in cardiac cells. *Embo J* **20**, 4998-5007.
- Roder, J. K., Roder, J. C. and Gerlai, R.** (1996a). Conspecific exploration in the T-maze: abnormalities in S100 beta transgenic mice. *Physiol Behav* **60**, 31-6.
- Roder, J. K., Roder, J. C. and Gerlai, R.** (1996b). Memory and the effect of cold shock in the water maze in S100 beta transgenic mice. *Physiol Behav* **60**, 611-5.
- Roesler, W. J., Vandenberg, G. R. and Hanson, R. W.** (1988). Cyclic AMP and the induction of eukaryotic gene transcription. *J Biol Chem* **263**, 9063-6.
- Rohacs, T., Tory, K., Dobos, A. and Spat, A.** (1997). Intracellular calcium release is more efficient than calcium influx in stimulating mitochondrial NAD(P)H formation in adrenal glomerulosa cells. *Biochem J* **328 (Pt 2)**, 525-8.
- Roise, D., Theiler, F., Horvath, S. J., Tomich, J. M., Richards, J. H., Allison, D. S. and Schatz, G.** (1988). Amphiphilicity is essential for mitochondrial presequence function. *Embo J* **7**, 649-53.
- Rojo, E. E., Stuart, R. A. and Neupert, W.** (1995). Conservative sorting of F₀-ATPase subunit 9: export from matrix requires delta pH across inner membrane and matrix ATP. *Embo J* **14**, 3445-51.
- Rojo, M., Hovius, R., Demel, R. A., Nicolay, K. and Wallimann, T.** (1991). Mitochondrial creatine kinase mediates contact formation between mitochondrial membranes. *J Biol Chem* **266**, 20290-5.
- Roll-Mecak, A. and Vale, R. D.** (2005). The Drosophila homologue of the hereditary spastic paraplegia protein, spastin, severs and disassembles microtubules. *Curr Biol* **15**, 650-5.
- Rudolf, R., Mongillo, M., Magalhaes, P. J. and Pozzan, T.** (2004). In vivo monitoring of Ca(2+) uptake into mitochondria of mouse skeletal muscle during contraction. *J Cell Biol* **166**, 527-36.
- Rusinol, A. E., Cui, Z., Chen, M. H. and Vance, J. E.** (1994). A unique mitochondria-associated membrane fraction from rat liver has a high capacity for lipid synthesis and contains pre-Golgi secretory proteins including nascent lipoproteins. *J Biol Chem* **269**, 27494-502.
- Rustandi, R. R., Baldissari, D. M., Drohat, A. C. and Weber, D. J.** (1999). Structural changes in the C-terminus of Ca²⁺-bound rat S100B (beta beta) upon binding to a peptide derived from the C-terminal regulatory domain of p53. *Protein Sci* **8**, 1743-51.
- Rustandi, R. R., Baldissari, D. M., Inman, K. G., Nizner, P., Hamilton, S. M., Landar, A., Landar, A., Zimmer, D. B. and Weber, D. J.** (2002). Three-dimensional solution structure of the calcium-signaling protein apo-S100A1 as determined by NMR. *Biochemistry* **41**, 788-96.
- Rustandi, R. R., Baldissari, D. M. and Weber, D. J.** (2000). Structure of the negative regulatory domain of p53 bound to S100B(beta beta). *Nat Struct Biol* **7**, 570-4.
- Rustandi, R. R., Drohat, A. C., Baldissari, D. M., Wilder, P. T. and Weber, D. J.** (1998). The Ca(2+)-dependent interaction of S100B(beta beta) with a peptide derived from p53. *Biochemistry* **37**, 1951-60.
- Ruthel, G. and Hollenbeck, P. J.** (2003). Response of mitochondrial traffic to axon determination and differential branch growth. *J Neurosci* **23**, 8618-24.
- Rutter, G. A., Burnett, P., Rizzuto, R., Brini, M., Murgia, M., Pozzan, T., Tavares, J. M. and Denton, R. M.** (1996). Subcellular imaging of intramitochondrial Ca²⁺ with recombinant targeted aequorin: significance for the regulation of pyruvate dehydrogenase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5489-94.
- Rutter, G. A. and Rizzuto, R.** (2000). Regulation of mitochondrial metabolism by ER Ca²⁺ release: an intimate connection. *Trends Biochem Sci* **25**, 215-21.
- Ryan, K. R., Menold, M. M., Garrett, S. and Jensen, R. E.** (1994). SMS1, a high-copy suppressor of the yeast mas6 mutant, encodes an essential inner membrane protein required for mitochondrial protein import. *Mol Biol Cell* **5**, 529-38.
- Saks, V. A., Kaambre, T., Sikk, P., Eimre, M., Orlova, E., Paju, K., Piirsoo, A., Appaix, F., Kay, L., Regitz-Zagrosek, V. et al.** (2001). Intracellular energetic units in red muscle cells. *Biochem J* **356**, 643-57.
- Santamaria-Kisiel, L., Rintala-Dempsey, A. C. and Shaw, G. S.** (2006). Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family. *Biochem J* **396**, 201-14.
- Santel, A., Frank, S., Gaume, B., Herrler, M., Youle, R. J. and Fuller, M. T.** (2003). Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. *J Cell Sci* **116**, 2763-74.
- Santel, A. and Fuller, M. T.** (2001). Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci* **114**, 867-74.
- Sarnat, H. B.** (1992). Regional differentiation of the human fetal ependyma: immunocytochemical markers. *J Neuropathol Exp Neurol* **51**, 58-75.

- Sastry, M., Ketchem, R. R., Crescenzi, O., Weber, C., Lubienski, M. J., Hidaka, H. and Chazin, W. J.** (1998). The three-dimensional structure of Ca(2+)-bound calyculin: implications for Ca(2+)-signal transduction by S100 proteins. *Structure* **6**, 223-31.
- Satoh, T., Ross, C. A., Villa, A., Supattapone, S., Pozzan, T., Snyder, S. H. and Meldolesi, J.** (1990). The inositol 1,4,5,-triphosphate receptor in cerebellar Purkinje cells: quantitative immunogold labeling reveals concentration in an ER subcompartment. *J Cell Biol* **111**, 615-24.
- Sauer, R. T., Bolon, D. N., Burton, B. M., Burton, R. E., Flynn, J. M., Grant, R. A., Hersch, G. L., Joshi, S. A., Kenniston, J. A., Levchenko, I. et al.** (2004). Sculpting the proteome with AAA(+) proteases and disassembly machines. *Cell* **119**, 9-18.
- Savchenko, V. L., McKanna, J. A., Nikonenko, I. R. and Skibo, G. G.** (2000). Microglia and astrocytes in the adult rat brain: comparative immunocytochemical analysis demonstrates the efficacy of lipocortin 1 immunoreactivity. *Neuroscience* **96**, 195-203.
- Schafer, B. W. and Heizmann, C. W.** (1996). The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem Sci* **21**, 134-40.
- Schaffrik, M., Mack, B., Matthias, C., Rauch, J. and Gires, O.** (2006). Molecular characterization of the tumor-associated antigen AAA-TOB3. *Cell Mol Life Sci*.
- Schmidt, M. C., Antweiler, S., Urban, N., Mueller, W., Kuklik, A., Meyer-Puttitz, B., Wiestler, O. D., Louis, D. N., Fimmers, R. and von Deimling, A.** (2002). Impact of genotype and morphology on the prognosis of glioblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol* **61**, 321-8.
- Schroder, R., Goudeau, B., Simon, M. C., Fischer, D., Eggermann, T., Clemen, C. S., Li, Z., Reimann, J., Xue, Z., Rudnik-Schoneborn, S. et al.** (2003). On noxious desmin: functional effects of a novel heterozygous desmin insertion mutation on the extrasarcomeric desmin cytoskeleton and mitochondria. *Hum Mol Genet* **12**, 657-69.
- Scorrano, L.** (2003). Divide et impera: Ca²⁺ signals, mitochondrial fission and sensitization to apoptosis. *Cell Death Differ* **10**, 1287-9.
- Scotto, C., Deloulme, J. C., Rousseau, D., Chambaz, E. and Baudier, J.** (1998). Calcium and S100B regulation of p53-dependent cell growth arrest and apoptosis. *Mol Cell Biol* **18**, 4272-81.
- Selinfreund, R. H., Barger, S. W., Pledger, W. J. and Van Eldik, L. J.** (1991). Neurotrophic protein S100 beta stimulates glial cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 3554-8.
- Selinfreund, R. H., Barger, S. W., Welsh, M. J. and Van Eldik, L. J.** (1990). Antisense inhibition of glial S100 beta production results in alterations in cell morphology, cytoskeletal organization, and cell proliferation. *J Cell Biol* **111**, 2021-8.
- Sesaki, H. and Jensen, R. E.** (1999). Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape. *J Cell Biol* **147**, 699-706.
- Shai, R., Shi, T., Kremen, T. J., Horvath, S., Liau, L. M., Cloughesy, T. F., Mischel, P. S. and Nelson, S. F.** (2003). Gene expression profiling identifies molecular subtypes of gliomas. *Oncogene* **22**, 4918-23.
- Shapiro, J. R. and Shapiro, W. R.** (1984). Clonal tumor cell heterogeneity. *Prog Exp Tumor Res* **27**, 49-66.
- Shapiro, L. A., Marks, A. and Whitaker-Azmitia, P. M.** (2004). Increased clusterin expression in old but not young adult S100B transgenic mice: evidence of neuropathological aging in a model of Down Syndrome. *Brain Res* **1010**, 17-21.
- Shapiro, L. A. and Whitaker-Azmitia, P. M.** (2004). Expression levels of cytoskeletal proteins indicate pathological aging of S100B transgenic mice: an immunohistochemical study of MAP-2, drebrin and GAP-43. *Brain Res* **1019**, 39-46.
- Shariful Islam, A. T., Nakamura, K., Seki, T., Kuraoka, A., Hirata, K., Emson, P. C. and Kawabuchi, M.** (1998). Expression of NOS, PSA-N-CAM and S100 protein in the granule cell migration pathway of the adult guinea pig forebrain. *Brain Res Dev Brain Res* **107**, 191-205.
- Sharma, V. K., Ramesh, V., Franzini-Armstrong, C. and Sheu, S. S.** (2000). Transport of Ca²⁺ from sarcoplasmic reticulum to mitochondria in rat ventricular myocytes. *J Bioenerg Biomembr* **32**, 97-104.
- Shashoua, V. E., Hesse, G. W. and Moore, B. W.** (1984). Proteins of the brain extracellular fluid: evidence for release of S-100 protein. *J Neurochem* **42**, 1536-41.
- Shaw, G. S., Hodges, R. S. and Sykes, B. D.** (1990). Calcium-induced peptide association to form an intact protein domain: 1H NMR structural evidence. *Science* **249**, 280-3.
- Shaw, S. S., Schmidt, A. M., Banes, A. K., Wang, X., Stern, D. M. and Marrero, M. B.** (2003). S100B-RAGE-mediated augmentation of angiotensin II-induced activation of JAK2 in vascular smooth muscle cells is dependent on PLD2. *Diabetes* **52**, 2381-8.
- Sheng, J. G., Mrak, R. E. and Griffin, W. S.** (1994). S100 beta protein expression in Alzheimer disease: potential role in the pathogenesis of neuritic plaques. *J Neurosci Res* **39**, 398-404.

- Sheng, J. G., Mrak, R. E., Rovnaghi, C. R., Kozłowska, E., Van Eldik, L. J. and Griffin, W. S.** (1996). Human brain S100 beta and S100 beta mRNA expression increases with age: pathogenic implications for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **17**, 359-63.
- Sheppard, C. A., Simpson, P. B., Sharp, A. H., Nucifora, F. C., Ross, C. A., Lange, G. D. and Russell, J. T.** (1997). Comparison of type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor distribution and subcellular Ca²⁺ release sites that support Ca²⁺ waves in cultured astrocytes. *J Neurochem* **68**, 2317-27.
- Sheu, F. S., Azmitia, E. C., Marshak, D. R., Parker, P. J. and Routtenberg, A.** (1994). Glial-derived S100b protein selectively inhibits recombinant beta protein kinase C (PKC) phosphorylation of neuron-specific protein F1/GAP43. *Brain Res Mol Brain Res* **21**, 62-6.
- Sheu, F. S., Huang, F. L. and Huang, K. P.** (1995). Differential responses of protein kinase C substrates (MARCKS, neuromodulin, and neurogranin) phosphorylation to calmodulin and S100. *Arch Biochem Biophys* **316**, 335-42.
- Shiao, Y. J., Balcerzak, B. and Vance, J. E.** (1998). A mitochondrial membrane protein is required for translocation of phosphatidylserine from mitochondria-associated membranes to mitochondria. *Biochem J* **331** (Pt 1), 217-23.
- Shiao, Y. J., Lupo, G. and Vance, J. E.** (1995). Evidence that phosphatidylserine is imported into mitochondria via a mitochondria-associated membrane and that the majority of mitochondrial phosphatidylethanolamine is derived from decarboxylation of phosphatidylserine. *J Biol Chem* **270**, 11190-8.
- Shore, G. C. and Tata, J. R.** (1977). Two fractions of rough endoplasmic reticulum from rat liver. I. Recovery of rapidly sedimenting endoplasmic reticulum in association with mitochondria. *J Cell Biol* **72**, 714-25.
- Shoshan-Barmatz, V., Zalk, R., Gincel, D. and Vardi, N.** (2004). Subcellular localization of VDAC in mitochondria and ER in the cerebellum. *Biochim Biophys Acta* **1657**, 105-14.
- Shuangshoti, S., Navalitloha, Y., Kasantikul, V., Shuangshoti, S. and Mutirangura, A.** (2000). Genetic heterogeneity and progression in different areas within high-grade diffuse astrocytoma. *Oncol Rep* **7**, 113-7.
- Siegel, N., Suhayda, C. and Haug, A.** (1982). Aluminum changes the conformation of calmodulin. *Physiol Chem Phys* **14**, 165-7.
- Sievers, J., Pehlemann, F. W., Gude, S., Hartmann, D. and Berry, M.** (1994). The development of the radial glial scaffold of the cerebellar cortex from GFAP-positive cells in the external granular layer. *J Neurocytol* **23**, 97-115.
- Simbeni, R., Paltauf, F. and Daum, G.** (1990). Intramitochondrial transfer of phospholipids in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **265**, 281-5.
- Simbeni, R., Pon, L., Zinser, E., Paltauf, F. and Daum, G.** (1991). Mitochondrial membrane contact sites of yeast. Characterization of lipid components and possible involvement in intramitochondrial translocation of phospholipids. *J Biol Chem* **266**, 10047-9.
- Simmen, T., Aslan, J. E., Blagoveshchenskaya, A. D., Thomas, L., Wan, L., Xiang, Y., Feliciangeli, S. F., Hung, C. H., Crump, C. M. and Thomas, G.** (2005). PACS-2 controls endoplasmic reticulum-mitochondria communication and Bid-mediated apoptosis. *Embo J* **24**, 717-29.
- Simmer, F., Moorman, C., van der Linden, A. M., Kuijk, E., van den Berghe, P. V., Kamath, R. S., Fraser, A. G., Ahringer, J. and Plasterk, R. H.** (2003). Genome-wide RNAi of *C. elegans* using the hypersensitive rrf-3 strain reveals novel gene functions. *PLoS Biol* **1**, E12.
- Simpson, P. B., Mehotra, S., Lange, G. D. and Russell, J. T.** (1997). High density distribution of endoplasmic reticulum proteins and mitochondria at specialized Ca²⁺ release sites in oligodendrocyte processes. *J Biol Chem* **272**, 22654-61.
- Simpson, P. B., Mehotra, S., Langley, D., Sheppard, C. A. and Russell, J. T.** (1998). Specialized distributions of mitochondria and endoplasmic reticulum proteins define Ca²⁺ wave amplification sites in cultured astrocytes. *J Neurosci Res* **52**, 672-83.
- Simpson, P. B. and Russell, J. T.** (1996). Mitochondria support inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated Ca²⁺ waves in cultured oligodendrocytes. *J Biol Chem* **271**, 33493-501.
- Sitaramayya, A.** (2002). Calcium-dependent activation of guanylate cyclase by S100b. *Adv Exp Med Biol* **514**, 389-98.
- Skulachev, V. P.** (1996). Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell. *FEBS Lett* **397**, 7-10.
- Skulachev, V. P.** (2001). Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. *Trends Biochem Sci* **26**, 23-9.
- Sleight, R. G. and Pagano, R. E.** (1983). Rapid appearance of newly synthesized phosphatidylethanolamine at the plasma membrane. *J Biol Chem* **258**, 9050-8.

- Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D. L. and van der Blik, A. M.** (2001). Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell* **12**, 2245-56.
- Smith, I. F., Boyle, J. P., Kang, P., Rome, S., Pearson, H. A. and Peers, C.** (2005). Hypoxic regulation of Ca²⁺ signaling in cultured rat astrocytes. *Glia* **49**, 153-7.
- Smith, J. S., Perry, A., Borell, T. J., Lee, H. K., O'Fallon, J., Hosek, S. M., Kimmel, D., Yates, A., Burger, P. C., Scheithauer, B. W. et al.** (2000). Alterations of chromosome arms 1p and 19q as predictors of survival in oligodendrogliomas, astrocytomas, and mixed oligoastrocytomas. *J Clin Oncol* **18**, 636-45.
- Smith, S. P. and Shaw, G. S.** (1998). A change-in-hand mechanism for S100 signalling. *Biochem Cell Biol* **76**, 324-33.
- Sommer, J. R. and Johnson, E. A.** (1970). Comparative ultrastructure of cardiac cell membrane specializations. A review. *Am J Cardiol* **25**, 184-94.
- Sonnichsen, B., Koski, L. B., Walsh, A., Marschall, P., Neumann, B., Brehm, M., Alleaume, A. M., Artelt, J., Bettencourt, P., Cassin, E. et al.** (2005). Full-genome RNAi profiling of early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **434**, 462-9.
- Sorci, G., Agneletti, A. L., Bianchi, R. and Donato, R.** (1998). Association of S100B with intermediate filaments and microtubules in glial cells. *Biochim Biophys Acta* **1448**, 277-89.
- Sorci, G., Agneletti, A. L. and Donato, R.** (2000). Effects of S100A1 and S100B on microtubule stability. An in vitro study using triton-cytoskeletons from astrocyte and myoblast cell lines. *Neuroscience* **99**, 773-83.
- Sorci, G., Bianchi, R., Giambanco, I., Rambotti, M. G. and Donato, R.** (1999). Replicating myoblasts and fused myotubes express the calcium-regulated proteins S100A1 and S100B. *Cell Calcium* **25**, 93-106.
- Sorci, G., Riuizi, F., Agneletti, A. L., Marchetti, C. and Donato, R.** (2003). S100B inhibits myogenic differentiation and myotube formation in a RAGE-independent manner. *Mol Cell Biol* **23**, 4870-81.
- Speer, O., Back, N., Buerklen, T., Brdiczka, D., Koretsky, A., Wallimann, T. and Eriksson, O.** (2005). Octameric mitochondrial creatine kinase induces and stabilizes contact sites between the inner and outer membrane. *Biochem J* **385**, 445-50.
- Squirrell, J. M., Lane, M. and Bavister, B. D.** (2001). Altering intracellular pH disrupts development and cellular organization in preimplantation hamster embryos. *Biol Reprod* **64**, 1845-54.
- Squirrell, J. M., Schramm, R. D., Paprocki, A. M., Wokosin, D. L. and Bavister, B. D.** (2003). Imaging mitochondrial organization in living primate oocytes and embryos using multiphoton microscopy. *Microsc Microanal* **9**, 190-201.
- Stanley, L. C., Mrak, R. E., Woody, R. C., Perrot, L. J., Zhang, S., Marshak, D. R., Nelson, S. J. and Griffin, W. S.** (1994). Glial cytokines as neuropathogenic factors in HIV infection: pathogenic similarities to Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **53**, 231-8.
- Stegert, M. R., Tamaskovic, R., Bichsel, S. J., Hergovich, A. and Hemmings, B. A.** (2004). Regulation of NDR2 protein kinase by multi-site phosphorylation and the S100B calcium-binding protein. *J Biol Chem* **279**, 23806-12.
- Stern, J. I. and Raizer, J. J.** (2006). Chemotherapy in the treatment of malignant gliomas. *Expert Rev Anticancer Ther* **6**, 755-67.
- Stone, S. J. and Vance, J. E.** (2000). Phosphatidylserine synthase-1 and -2 are localized to mitochondria-associated membranes. *J Biol Chem* **275**, 34534-40.
- Stowers, R. S., Megeath, L. J., Gorska-Andrzejak, J., Meinertzhagen, I. A. and Schwarz, T. L.** (2002). Axonal transport of mitochondria to synapses depends on Milton, a novel *Drosophila* protein. *Neuron* **36**, 1063-77.
- Straub, S. V., Giovannucci, D. R. and Yule, D. I.** (2000). Calcium wave propagation in pancreatic acinar cells: functional interaction of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors, ryanodine receptors, and mitochondria. *J Gen Physiol* **116**, 547-60.
- Straube-West, K., Loomis, P. A., Opal, P. and Goldman, R. D.** (1996). Alterations in neural intermediate filament organization: functional implications and the induction of pathological changes related to motor neuron disease. *J Cell Sci* **109** (Pt 9), 2319-29.
- Strynadka, N. C., Cherney, M., Sielecki, A. R., Li, M. X., Smillie, L. B. and James, M. N.** (1997). Structural details of a calcium-induced molecular switch: X-ray crystallographic analysis of the calcium-saturated N-terminal domain of troponin C at 1.75 Å resolution. *J Mol Biol* **273**, 238-55.
- Strynadka, N. C. and James, M. N.** (1989). Crystal structures of the helix-loop-helix calcium-binding proteins. *Annu Rev Biochem* **58**, 951-98.
- Stuart, R. A., Ono, H., Langer, T. and Neupert, W.** (1996). Mechanisms of protein import into mitochondria. *Cell Struct Funct* **21**, 403-6.

- Stupp, R., Hegi, M. E., van den Bent, M. J., Mason, W. P., Weller, M., Mirimanoff, R. O. and Cairncross, J. G.** (2006). Changing paradigms--an update on the multidisciplinary management of malignant glioma. *Oncologist* **11**, 165-80.
- Stuve, L. L. and Myers, R. M.** (1990). A directly repeated sequence in the beta-globin promoter regulates transcription in murine erythroleukemia cells. *Mol Cell Biol* **10**, 972-81.
- Sugioka, R., Shimizu, S. and Tsujimoto, Y.** (2004). Fzo1, a protein involved in mitochondrial fusion, inhibits apoptosis. *J Biol Chem* **279**, 52726-34.
- Sundler, R. and Akesson, B.** (1975). Biosynthesis of phosphatidylethanolamines and phosphatidylcholines from ethanolamine and choline in rat liver. *Biochem J* **146**, 309-15.
- Suzuki, A., Ogura, T. and Esumi, H.** (2006). NDR2 acts as the upstream kinase of ARK5 during insulin-like growth factor-1 signaling. *J Biol Chem* **281**, 13915-21.
- Szalai, G., Csordas, G., Hantash, B. M., Thomas, A. P. and Hajnoczky, G.** (2000). Calcium signal transmission between ryanodine receptors and mitochondria. *J Biol Chem* **275**, 15305-13.
- Szalai, G., Krishnamurthy, R. and Hajnoczky, G.** (1999). Apoptosis driven by IP(3)-linked mitochondrial calcium signals. *Embo J* **18**, 6349-61.
- Takei, K., Stukenbrok, H., Metcalf, A., Mignery, G. A., Sudhof, T. C., Volpe, P. and De Camilli, P.** (1992). Ca²⁺ stores in Purkinje neurons: endoplasmic reticulum subcompartments demonstrated by the heterogeneous distribution of the InsP3 receptor, Ca(2+)-ATPase, and calsequestrin. *J Neurosci* **12**, 489-505.
- Tamaskovic, R., Bichsel, S. J. and Hemmings, B. A.** (2003). NDR family of AGC kinases--essential regulators of the cell cycle and morphogenesis. *FEBS Lett* **546**, 73-80.
- Tanaka, Y., Kanai, Y., Okada, Y., Nonaka, S., Takeda, S., Harada, A. and Hirokawa, N.** (1998). Targeted disruption of mouse conventional kinesin heavy chain, kif5B, results in abnormal perinuclear clustering of mitochondria. *Cell* **93**, 1147-58.
- Tang, Y. and Zucker, R. S.** (1997). Mitochondrial involvement in post-tetanic potentiation of synaptic transmission. *Neuron* **18**, 483-91.
- Tarabykina, S., Kriajevska, M., Scott, D. J., Hill, T. J., Lafitte, D., Derrick, P. J., Dodson, G. G., Lukanidin, E. and Bronstein, I.** (2000). Heterocomplex formation between metastasis-related protein S100A4 (Mts1) and S100A1 as revealed by the yeast two-hybrid system. *FEBS Lett* **475**, 187-91.
- Teo, T. S. and Wang, J. H.** (1973). Mechanism of activation of a cyclic adenosine 3':5'-monophosphate phosphodiesterase from bovine heart by calcium ions. Identification of the protein activator as a Ca²⁺ binding protein. *J Biol Chem* **248**, 5950-5.
- Tijburg, L. B., Geelen, M. J. and Van Golde, L. M.** (1989). Biosynthesis of phosphatidylethanolamine via the CDP-ethanolamine route is an important pathway in isolated rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **160**, 1275-80.
- Tinel, H., Cancela, J. M., Mogami, H., Gerasimenko, J. V., Gerasimenko, O. V., Tepikin, A. V. and Petersen, O. H.** (1999). Active mitochondria surrounding the pancreatic acinar granule region prevent spreading of inositol trisphosphate-evoked local cytosolic Ca(2+) signals. *Embo J* **18**, 4999-5008.
- Tramontina, F., Tramontina, A. C., Souza, D. F., Leite, M. C., Gottfried, C., Souza, D. O., Wofchuk, S. T. and Goncalves, C. A.** (2006). Glutamate uptake is stimulated by extracellular S100B in hippocampal astrocytes. *Cell Mol Neurobiol* **26**, 81-6.
- Treack, H. H. and Pirsig, W.** (1979). Differentiation of nerve endings in the cochlear nucleus on morphological and experimental basis. *Acta Otolaryngol* **87**, 47-60.
- Trinczek, B., Ebnet, A., Mandelkow, E. M. and Mandelkow, E.** (1999). Tau regulates the attachment/detachment but not the speed of motors in microtubule-dependent transport of single vesicles and organelles. *J Cell Sci* **112** (Pt 14), 2355-67.
- Trotter, P. J., Pedretti, J. and Voelker, D. R.** (1993). Phosphatidylserine decarboxylase from *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation of mutants, cloning of the gene, and creation of a null allele. *J Biol Chem* **268**, 21416-24.
- Trotter, P. J. and Voelker, D. R.** (1995). Identification of a non-mitochondrial phosphatidylserine decarboxylase activity (PSD2) in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **270**, 6062-70.
- Tsoporis, J. N., Marks, A., Haddad, A., Dawood, F., Liu, P. P. and Parker, T. G.** (2005). S100B expression modulates left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Circulation* **111**, 598-606.
- Tsoporis, J. N., Marks, A., Kahn, H. J., Butany, J. W., Liu, P. P., O'Hanlon, D. and Parker, T. G.** (1997). S100beta inhibits alpha1-adrenergic induction of the hypertrophic phenotype in cardiac myocytes. *J Biol Chem* **272**, 31915-21.
- Tubaro C., A. C., Donato R.** (2006). S100B in myoblasts inhibits myotube formation by interfering with MYOD expression. In *9th meetinf of the european calcium society*.
- Ueda, S., Kokotos Leonardi, E. T., Bell, J., 3rd and Azmitia, E. C.** (1995). Serotonergic sprouting into transplanted C-6 gliomas is blocked by S-100 beta antisense gene. *Brain Res Mol Brain Res* **29**, 365-8.

- Uhrbom, L., Dai, C., Celestino, J. C., Rosenblum, M. K., Fuller, G. N. and Holland, E. C.** (2002). Ink4a-Arf loss cooperates with KRas activation in astrocytes and neural progenitors to generate glioblastomas of various morphologies depending on activated Akt. *Cancer Res* **62**, 5551-8.
- Valley, K. M., Rustandi, R. R., Ellis, K. C., Varlamova, O., Bresnick, A. R. and Weber, D. J.** (2002). Solution structure of human Mts1 (S100A4) as determined by NMR spectroscopy. *Biochemistry* **41**, 12670-80.
- Van Hartesveldt, C., Moore, B. and Hartman, B. K.** (1986). Transient midline raphe glial structure in the developing rat. *J Comp Neurol* **253**, 174-84.
- Vance, J. E.** (1988). Compartmentalization and differential labeling of phospholipids of rat liver subcellular membranes. *Biochim Biophys Acta* **963**, 10-20.
- Vance, J. E.** (1990). Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *J Biol Chem* **265**, 7248-56.
- Vance, J. E.** (1991). Newly made phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine are preferentially translocated between rat liver mitochondria and endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **266**, 89-97.
- Vance, J. E. and Steenbergen, R.** (2005). Metabolism and functions of phosphatidylserine. *Prog Lipid Res* **44**, 207-34.
- Varadi, A., Cirulli, V. and Rutter, G. A.** (2004a). Mitochondrial localization as a determinant of capacitance Ca²⁺ entry in HeLa cells. *Cell Calcium* **36**, 499-508.
- Varadi, A., Johnson-Cadwell, L. I., Cirulli, V., Yoon, Y., Allan, V. J. and Rutter, G. A.** (2004b). Cytoplasmic dynein regulates the subcellular distribution of mitochondria by controlling the recruitment of the fission factor dynamin-related protein-1. *J Cell Sci* **117**, 4389-400.
- Veltri, K. L., Espiritu, M. and Singh, G.** (1990). Distinct genomic copy number in mitochondria of different mammalian organs. *J Cell Physiol* **143**, 160-4.
- Verstreken, P., Ly, C. V., Venken, K. J., Koh, T. W., Zhou, Y. and Bellen, H. J.** (2005). Synaptic mitochondria are critical for mobilization of reserve pool vesicles at *Drosophila* neuromuscular junctions. *Neuron* **47**, 365-78.
- Vidugiriene, J., Sharma, D. K., Smith, T. K., Baumann, N. A. and Menon, A. K.** (1999). Segregation of glycosylphosphatidylinositol biosynthetic reactions in a subcompartment of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **274**, 15203-12.
- Vijayarathy, C., Biunno, I., Lenka, N., Yang, M., Basu, A., Hall, I. P. and Avadhani, N. G.** (1998). Variations in the subunit content and catalytic activity of the cytochrome c oxidase complex from different tissues and different cardiac compartments. *Biochim Biophys Acta* **1371**, 71-82.
- Voelker, D. R.** (1984). Phosphatidylserine functions as the major precursor of phosphatidylethanolamine in cultured BHK-21 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 2669-73.
- Voelker, D. R.** (1985). Disruption of phosphatidylserine translocation to the mitochondria in baby hamster kidney cells. *J Biol Chem* **260**, 14671-6.
- Voelker, D. R.** (1989a). Phosphatidylserine translocation to the mitochondrion is an ATP-dependent process in permeabilized animal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 9921-5.
- Voelker, D. R.** (1989b). Reconstitution of phosphatidylserine import into rat liver mitochondria. *J Biol Chem* **264**, 8019-25.
- Voelker, D. R.** (1990). Characterization of phosphatidylserine synthesis and translocation in permeabilized animal cells. *J Biol Chem* **265**, 14340-6.
- Voelker, D. R.** (1991). Adriamycin disrupts phosphatidylserine import into the mitochondria of permeabilized CHO-K1 cells. *J Biol Chem* **266**, 12185-8.
- Voelker, D. R.** (1993). The ATP-dependent translocation of phosphatidylserine to the mitochondria is a process that is restricted to the autologous organelle. *J Biol Chem* **268**, 7069-74.
- Voeltz, G. K., Prinz, W. A., Shibata, Y., Rist, J. M. and Rapoport, T. A.** (2006). A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum. *Cell* **124**, 573-86.
- Wang, G., Rudland, P. S., White, M. R. and Barraclough, R.** (2000a). Interaction in vivo and in vitro of the metastasis-inducing S100 protein, S100A4 (p9Ka) with S100A1. *J Biol Chem* **275**, 11141-6.
- Wang, H. J., Guay, G., Pogan, L., Sauve, R. and Nabi, I. R.** (2000b). Calcium regulates the association between mitochondria and a smooth subdomain of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **150**, 1489-98.
- Watson, G. A., Kadota, R. P. and Wisoff, J. H.** (2001a). Multidisciplinary management of pediatric low-grade gliomas. *Semin Radiat Oncol* **11**, 152-62.
- Watson, M. A., Perry, A., Budhraj, V., Hicks, C., Shannon, W. D. and Rich, K. M.** (2001b). Gene expression profiling with oligonucleotide microarrays distinguishes World Health Organization grade of oligodendrogliomas. *Cancer Res* **61**, 1825-9.
- Wear, M. A. and Cooper, J. A.** (2004). Capping protein binding to S100B: implications for the tentacle model for capping the actin filament barbed end. *J Biol Chem* **279**, 14382-90.

- Webb, C. T., Gorman, M. A., Lazarou, M., Ryan, M. T. and Gulbis, J. M.** (2006). Crystal structure of the mitochondrial chaperone TIM9.10 reveals a six-bladed alpha-propeller. *Mol Cell* **21**, 123-33.
- Weiss, W. A., Burns, M. J., Hackett, C., Aldape, K., Hill, J. R., Kuriyama, H., Kuriyama, N., Milshteyn, N., Roberts, T., Wendland, M. F. et al.** (2003). Genetic determinants of malignancy in a mouse model for oligodendroglioma. *Cancer Res* **63**, 1589-95.
- Whitaker-Azmitia, P. M. and Azmitia, E. C.** (1989). Stimulation of astroglial serotonin receptors produces culture media which regulates growth of serotonergic neurons. *Brain Res* **497**, 80-5.
- Whitaker-Azmitia, P. M., Murphy, R. and Azmitia, E. C.** (1990). Stimulation of astroglial 5-HT_{1A} receptors releases the serotonergic growth factor, protein S-100, and alters astroglial morphology. *Brain Res* **528**, 155-8.
- Whitaker-Azmitia, P. M., Wingate, M., Borella, A., Gerlai, R., Roder, J. and Azmitia, E. C.** (1997). Transgenic mice overexpressing the neurotrophic factor S-100 beta show neuronal cytoskeletal and behavioral signs of altered aging processes: implications for Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Brain Res* **776**, 51-60.
- Wilder, P. T., Baldisseri, D. M., Udan, R., Vallely, K. M. and Weber, D. J.** (2003). Location of the Zn(2+)-binding site on S100B as determined by NMR spectroscopy and site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **42**, 13410-21.
- Wilder, P. T., Rustandi, R. R., Drohat, A. C. and Weber, D. J.** (1998). S100B(beta beta) inhibits the protein kinase C-dependent phosphorylation of a peptide derived from p53 in a Ca²⁺-dependent manner. *Protein Sci* **7**, 794-8.
- Wilding, J. R., Joubert, F., de Araujo, C., Fortin, D., Novotova, M., Veksler, V. and Ventura-Clapier, R.** (2006). Altered energy transfer from mitochondria to sarcoplasmic reticulum after cytoarchitectural perturbations in mice hearts. *J Physiol* **575**, 191-200.
- Wills, F. L., McCubbin, W. D. and Kay, C. M.** (1993). Characterization of the smooth muscle calponin and calmodulin complex. *Biochemistry* **32**, 2321-8.
- Winningham-Major, F., Staecker, J. L., Barger, S. W., Coats, S. and Van Eldik, L. J.** (1989). Neurite extension and neuronal survival activities of recombinant S100 beta proteins that differ in the content and position of cysteine residues. *J Cell Biol* **109**, 3063-71.
- Wong-Riley, M. T. and Carroll, E. W.** (1984). Quantitative light and electron microscopic analysis of cytochrome oxidase-rich zones in V II prestriate cortex of the squirrel monkey. *J Comp Neurol* **222**, 18-37.
- Wong-Riley, M. T. and Welt, C.** (1980). Histochemical changes in cytochrome oxidase of cortical barrels after vibrissal removal in neonatal and adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 2333-7.
- Wood, J. D., Landers, J. A., Bingley, M., McDermott, C. J., Thomas-McArthur, V., Gleadall, L. J., Shaw, P. J. and Cunliffe, V. T.** (2006). The microtubule-severing protein Spastin is essential for axon outgrowth in the zebrafish embryo. *Hum Mol Genet* **15**, 2763-71.
- Wozniak, M. J., Melzer, M., Dorner, C., Haring, H. U. and Lammers, R.** (2005). The novel protein KBP regulates mitochondria localization by interaction with a kinesin-like protein. *BMC Cell Biol* **6**, 35.
- Wu, Q., Sandrock, T. M., Turgeon, B. G., Yoder, O. C., Wirsal, S. G. and Aist, J. R.** (1998). A fungal kinesin required for organelle motility, hyphal growth, and morphogenesis. *Mol Biol Cell* **9**, 89-101.
- Wu, W. I. and Voelker, D. R.** (2001). Characterization of phosphatidylserine transport to the locus of phosphatidylserine decarboxylase 2 in permeabilized yeast. *J Biol Chem* **276**, 7114-21.
- Wu, W. I. and Voelker, D. R.** (2002). Biochemistry and genetics of interorganelle aminoglycerophospholipid transport. *Semin Cell Dev Biol* **13**, 185-95.
- Xiong, Z., O'Hanlon, D., Becker, L. E., Roder, J., MacDonald, J. F. and Marks, A.** (2000). Enhanced calcium transients in glial cells in neonatal cerebellar cultures derived from S100B null mice. *Exp Cell Res* **257**, 281-9.
- Yaffe, M. P., Stuurman, N. and Vale, R. D.** (2003). Mitochondrial positioning in fission yeast is driven by association with dynamic microtubules and mitotic spindle poles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11424-8.
- Yang, F., He, X. P., Russell, J. and Lu, B.** (2003). Ca²⁺ influx-independent synaptic potentiation mediated by mitochondrial Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger and protein kinase C. *J Cell Biol* **163**, 511-23.
- Yang, Q., Hamberger, A., Hyden, H., Wang, S., Stigbrand, T. and Haglid, K. G.** (1995a). S-100 beta has a neuronal localisation in the rat hindbrain revealed by an antigen retrieval method. *Brain Res* **696**, 49-61.
- Yang, Q., Hou, X., Hamberger, A., Wang, S., Dahlstrom, A. and Haglid, K. G.** (1995b). S-100 beta immunoreactivity in neurones of the rat peripheral sensory ganglia. *Neuroreport* **6**, 2005-9.
- Yang, Q., O'Hanlon, D., Heizmann, C. W. and Marks, A.** (1999). Demonstration of heterodimer formation between S100B and S100A6 in the yeast two-hybrid system and human melanoma. *Exp Cell Res* **246**, 501-9.

- Yi, M., Weaver, D. and Hajnoczky, G.** (2004). Control of mitochondrial motility and distribution by the calcium signal: a homeostatic circuit. *J Cell Biol* **167**, 661-72.
- Yoon, Y., Krueger, E. W., Oswald, B. J. and McNiven, M. A.** (2003). The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Mol Cell Biol* **23**, 5409-20.
- Yoshikawa, T., Nagasugi, Y., Azuma, T., Kato, M., Sugano, S., Hashimoto, K., Masuho, Y., Muramatsu, M. and Seki, N.** (2000). Isolation of novel mouse genes differentially expressed in brain using cDNA microarray. *Biochem Biophys Res Commun* **275**, 532-7.
- Yu, H., Olshevskaya, E., Duda, T., Seno, K., Hayashi, F., Sharma, R. K., Dizhoor, A. M. and Yamazaki, A.** (1999). Activation of retinal guanylyl cyclase-1 by Ca²⁺-binding proteins involves its dimerization. *J Biol Chem* **274**, 15547-55.
- Yu, R. C., Hanson, P. I., Jahn, R. and Brunger, A. T.** (1998). Structure of the ATP-dependent oligomerization domain of N-ethylmaleimide sensitive factor complexed with ATP. *Nat Struct Biol* **5**, 803-11.
- Yu, W. H. and Fraser, P. E.** (2001). S100beta interaction with tau is promoted by zinc and inhibited by hyperphosphorylation in Alzheimer's disease. *J Neurosci* **21**, 2240-6.
- Zborowski, J., Dygas, A. and Wojtczak, L.** (1983). Phosphatidylserine decarboxylase is located on the external side of the inner mitochondrial membrane. *FEBS Lett* **157**, 179-82.
- Zelinski, T. A. and Choy, P. C.** (1982). Phosphatidylethanolamine biosynthesis in isolated hamster heart. *Can J Biochem* **60**, 817-23.
- Zeller, K. I., Jegga, A. G., Aronow, B. J., O'Donnell, K. A. and Dang, C. V.** (2003). An integrated database of genes responsive to the Myc oncogenic transcription factor: identification of direct genomic targets. *Genome Biol* **4**, R69.
- Zeng, F. Y., Gerke, V. and Gabius, H. J.** (1993). Identification of annexin II, annexin VI and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as calyculin-binding proteins in bovine heart. *Int J Biochem* **25**, 1019-27.
- Zhang, H., Wang, G., Ding, Y., Wang, Z., Barraclough, R., Rudland, P. S., Fernig, D. G. and Rao, Z.** (2003). The crystal structure at 2A resolution of the Ca²⁺-binding protein S100P. *J Mol Biol* **325**, 785-94.
- Zhang, M. Z. and McKanna, J. A.** (1997). Gliogenesis in postnatal rat optic nerve: LC1 + microglia and S100-beta + astrocytes. *Brain Res Dev Brain Res* **101**, 27-36.
- Zhang, X., Shaw, A., Bates, P. A., Newman, R. H., Gowen, B., Orlova, E., Gorman, M. A., Kondo, H., Dokurno, P., Lally, J. et al.** (2000). Structure of the AAA ATPase p97. *Mol Cell* **6**, 1473-84.
- Zhukova, L., Zhukov, I., Bal, W. and Wyslouch-Cieszynska, A.** (2004). Redox modifications of the C-terminal cysteine residue cause structural changes in S100A1 and S100B proteins. *Biochim Biophys Acta* **1742**, 191-201.
- Ziegler, D. R., Innocente, C. E., Leal, R. B., Rodnight, R. and Goncalves, C. A.** (1998). The S100B protein inhibits phosphorylation of GFAP and vimentin in a cytoskeletal fraction from immature rat hippocampus. *Neurochem Res* **23**, 1259-63.
- Zimmer, D. B., Chessher, J. and Song, W.** (1996). Nucleotide homologies in genes encoding members of the S100 protein family. *Biochim Biophys Acta* **1313**, 229-38.
- Zimmer, D. B. and Landar, A.** (1995). Analysis of S100A1 expression during skeletal muscle and neuronal cell differentiation. *J Neurochem* **64**, 2727-36.
- Zimmer, D. B. and Van Eldik, L. J.** (1986). Identification of a molecular target for the calcium-modulated protein S100. Fructose-1,6-bisphosphate aldolase. *J Biol Chem* **261**, 11424-8.
- Zuchner, S., Mersiyanova, I. V., Muglia, M., Bissar-Tadmouri, N., Rochelle, J., Dadali, E. L., Zappia, M., Nelis, E., Patitucci, A., Senderek, J. et al.** (2004). Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet* **36**, 449-51.
- Zuchner, S. and Vance, J. M.** (2005). Emerging pathways for hereditary axonopathies. *J Mol Med* **83**, 935-43.
- Zuchner, S., Wang, G., Tran-Viet, K. N., Nance, M. A., Gaskell, P. C., Vance, J. M., Ashley-Koch, A. E. and Pericak-Vance, M. A.** (2006). Mutations in the novel mitochondrial protein REEP1 cause hereditary spastic paraplegia type 31. *Am J Hum Genet* **79**, 365-9.
- Zuckerman, J. E., Herschman, H. R. and Levine, L.** (1970). Appearance of a brain specific antigen (th S-100 protein) during human foetal development. *J Neurochem* **17**, 247-51.

Résumé

Identification et caractérisation comme cible de la S100B d'une protéine impliquée dans la distribution subcellulaire des mitochondries

Les mitochondries appartiennent à un réseau dynamique et doivent être positionnées de manière stratégique dans la cellule. 15 % des mitochondries sont en contact étroit avec le réticulum endoplasmique (RE), et il a été proposé que la calciprotéine S100B régule les interactions entre le RE et les mitochondries. Cependant, une localisation perimitochondriale de la S100B n'a jamais été montrée, ni sa cible mitochondriale identifiée. Après avoir montré dans les cellules progénitrices oligodendrogiales (CPO) que la S100B interagit avec les mitochondries, nous avons identifié par une approche de Far Western une protéine comme cible de la S100B. Aucune étude préalable ne porte sur la fonction de cette protéine, qui par ailleurs appartient à la famille AAA (Atpases Associées à des Activités variées). Nous l'avons nommée MSBP pour « Mitochondria S100B Binding Protein ». MSBP est transmembranaire, localisée aux sites de contacts entre les membranes internes et externes des mitochondries, le domaine N-terminal exposé côté cytosolique, et la boîte ATPase du côté C-terminal protégée à l'intérieur de la mitochondrie. Comparée aux autres membres de la famille S100, la S100B interagit de façon spécifique avec la protéine MSBP, dont elle inhibe de manière dépendante du calcium l'oligomérisation. Dans les CPO, il avait été montré que l'inactivation de la S100B induit un ralentissement de leur différenciation. Nous montrons ici que la diminution de l'expression de sa cible MSBP par une approche siRNA a un effet similaire.

La fonction cellulaire de MSBP a été analysée plus en détail dans la lignée cellulaire gliale U373, l'inactivation de l'expression de la protéine MSBP par siRNA et l'inhibition de son activité ATPase par une mutation ponctuelle ont des effets opposés sur la distribution des mitochondries : la protéine MSBP est nécessaire à l'ancrage des mitochondries à un pôle du noyau, tandis que son activité ATPase permet la libération des mitochondries de ce centre organisateur périnucléaire. L'inactivation de l'expression de la protéine MSBP, outre la dispersion des mitochondries vers la périphérie, s'accompagne d'une diminution des interactions entre le RE et les mitochondries et d'une diminution des transferts de phosphatidylserine (PS) qui nécessitent une interaction entre ces organelles.

Expression des protéines MSBP dans les gliomes

Les gènes codant pour les protéines MSBP1 et MSBP2 sont localisés à l'extrémité distale du chromosome 1 au locus 1p36, qui se caractérise par une perte d'hétérozygotie dans les oligodendrogliomes. Nous montrons que l'expression de la protéine MSBP2 pourrait être utilisée comme un marqueur pour différencier les glioblastomes des oligodendrogliomes : alors que la protéines MSBP2 est détectée dans les glioblastomes, elle ne l'est pas dans les oligodendrogliomes. D'autre part, dans la lignée cellulaire HS683 dérivée d'un oligodendrogliome, l'absence d'expression de la protéine MSBP2 résulte d'une délétion homozygote qui tronque la partie 5' du gène codant pour MSBP2. L'étendue de cette délétion homozygote recouvre une région très restreinte, et ne concerne que deux gènes, dont le gène codant MSBP2. Bien plus, dans la lignée U373, l'inhibition de l'expression des gènes MSBP par siRNA favorise la prolifération, et la croissance indépendante de l'ancrage en Soft agar, tandis que leur surexpression se caractérise par un effet opposé. Ces résultats suggèrent que l'inactivation du gène MSBP2 pourrait participer à la transformation cellulaire et favoriser ainsi le développement des oligodendrogliomes.