

Analyse de l'article
« La mitochondrie au cœur du suicide cellulaire »
Biofutur n° 252 février 2005
STS Bio Analyses et Contrôles 2^{ème} année

NB : L'objectif de cette analyse n'est pas de recopier l'article mais de dégager avec vos propres mots les idées fortes en se guidant du questionnaire. La figure 1 a été supprimée.

1 Définir les termes suivants :

- Nécrose - Apoptose - Apoptosome - MCP	- Caspases - Famille Bcl-2 - Autophagie
--------------------------------------------------	-----------------------------------------------

2 La notion d'apoptose

- 2.1. Expliquer pourquoi l'apoptose est un processus naturel dans la vie d'une cellule. Justifier la réponse.
- 2.2. Présenter les différents types de MCP mis en évidence à ce jour. Détailler leurs caractéristiques (similitudes et différences)

3. La mitochondrie au cœur du mécanisme de l'apoptose

- 3.1. Préciser la structure de l'apoptosome et l'origine de ses principaux constituants. Donner la fonction biologique de ce complexe
- 3.2. A l'aide d'un tableau, lister les principaux activateurs de l'apoptose et les principaux inhibiteurs. Préciser leur cible
- 3.3. Quelles sont les principales hypothèses expliquant le relargage par la mitochondrie de ces régulateurs ? (réponse brève exigée)
- 3.4. Comment l'interruption de la chaîne respiratoire peut-elle favoriser le mécanisme de mort cellulaire ?

4. Perspective de l'étude des mécanismes de l'apoptose

Justifier que l'étude de l'apoptose permet d'envisager des solutions dans la lutte contre le cancer

La mitochondrie au cœur du suicide cellulaire

La mort cellulaire programmée joue un rôle crucial dans le bon fonctionnement des organismes vivants et son dérèglement a été associé à de nombreux processus pathologiques. S'il a été identifié trois types de mort cellulaire programmée, toutes ont un effecteur commun : la mitochondrie. En effet, cet organelle initialement considéré comme n'étant que la source d'énergie de la cellule s'est révélé être une redoutable machine à tuer.

Marlène Bras* et Santos A. Susin*

* Apoptose et Système Immunitaire, CNRS-URA 1961 Institut Pasteur, 25 rue du Dr Roux, 75015 Paris

L'idée que la mort est essentielle au fonctionnement normal et physiologique des organismes pluricellulaires s'est imposée assez tard dans les consciences scientifiques. Cependant, dès l'Antiquité, Galien avait remarqué que certaines structures étaient amenées à disparaître au cours du développement. Il avait ainsi observé que le canal artériel, permettant la circulation directe du sang entre l'artère pulmonaire et l'aorte sans passer par les poumons fœtaux, avait une existence transitoire et disparaissait à la naissance. Bien évidemment, Galien ne parlait pas de mort cellulaire, puisque le concept de cellule n'existait pas encore. Cependant, presque immédiatement après la « découverte » de la cellule en 1839 par Schleiden et Schwann, les travaux de Vogt sur la métamorphose des amphibiens permirent d'introduire la notion de mort cellulaire. Le phénomène de mort cellulaire fut étudié pendant un siècle entier avant qu'une explication satisfaisante de sa fonction ne soit donnée. Si l'observation de la mort cellulaire pendant le développement embryonnaire conduisit certains scientifiques à la définir comme un événement programmé, d'autres la considérèrent comme une réponse totalement passive de la cellule à des dommages externes.

En 1972, Kerr, Wyllie et Currie proposèrent une théorie de la mort cellulaire qui allait réconcilier les deux écoles de pensée (1). Ils définirent ainsi la nécrose comme une mort violente et accidentelle initiée par des stimuli environnementaux et résultant en une désorganisation rapide de l'homéostasie cellulaire. Par opposition, ils

désignèrent sous le terme d'apoptose une mort cellulaire programmée et hautement régulée. Du terme grec désignant la chute naturelle des feuilles à l'automne, l'apoptose vint alors compléter avec la mitose et la croissance cellulaire les grandes fonctions physiologiques de la cellule.

La mort cellulaire programmée (MCP) joue un rôle capital tout au long de la vie de l'individu. Ainsi, dès les premières étapes de la vie, elle est impliquée dans la sculpture de l'embryon, dans le développement de son système immunitaire ou encore de son système nerveux. La MCP va ensuite jouer le rôle de gardien de l'homéostasie cellulaire. La dérégulation de la MCP est un facteur déterminant dans de nombreux cancers. Un défaut d'apoptose est en effet à l'origine de la formation des tumeurs solides et du développement des leucémies, des lymphomes et de certaines maladies auto-immunes, tandis qu'un excès d'apoptose peut produire des pathologies telles que le Sida, liées à une disparition accrue des cellules.

La classification...

Basée sur les altérations morphologiques observées lors de la mort cellulaire, la classification établie par Clarke en 1990 permet de subdiviser la mort cellulaire programmée en trois groupes (2).

La MCP de type I qui définit l'apoptose « classique » identifiée par Kerr et Wyllie est caractérisée par une condensation de la cellule tant au niveau de son

- (1) JFR Kerr *et al* (1972) *Br J Cancer* 26, 239-57
(2) PGH Clarke (1990) *Anal Embryol* 181, 195-213

cytoplasme que de son noyau. L'ADN se fragmente, la chromatine se condense et la cellule se désintègre de façon contrôlée en petits morceaux appelés corps apoptotiques phagocytés par des cellules environnantes. Différentes approches biochimiques ont permis de mettre en évidence certaines protéases à cystéine (les caspases) ainsi que certaines protéines contenues dans la mitochondrie comme étant les médiateurs de la MCP de type I. On connaît maintenant 14 caspases différentes, nommées caspase-1, -2, -3, etc. L'activation en cascade de cette famille de protéases permet l'amplification du signal apoptotique. En effet, leur activation conduit au clivage de diverses protéines cellulaires à l'origine de la plupart des événements biochimiques ou morphologiques caractérisant la MCP de type I.

Par contraste, la MCP de type II est marquée par une autophagocytose des organelles intracellulaires. Cette forme de mort est caractérisée principalement par la formation de vacuoles autophagiques cytosoliques, ainsi que par une dilatation des organelles intracellulaires. Bien qu'il existe une controverse sur l'origine de ces vacuoles autophagiques, l'appareil de Golgi ou encore le réticulum endoplasmique ayant été incriminés, celles-ci vont finalement fusionner avec les lysosomes de la cellule où les éléments cytoplasmiques séquestrés vont être dégradés.

La MCP de type III encore désignée sous le terme anglosaxon de mort «*necrosis-like*» est caractérisée par une absence d'implication des lysosomes. C'est un suicide principalement cytosolique : les organelles intracellulaires se dilatent et la membrane plasmique peut

se rompre selon les systèmes. Dans certains cas, la cellule morte va pouvoir également être phagocytée. Les MCP de type II et III semblent se dérouler sans l'intervention des caspases.

Bien que ce système de classification fournisse des outils très utiles dans l'étude de la mort cellulaire, il ne reflète pas les interactions sophistiquées qui existent entre ces différents types d'apoptose. En effet, des recherches biochimiques ont mis en évidence le rôle central de la mitochondrie dans la mort cellulaire. Initialement considérée comme n'étant que la source d'énergie de la cellule, la mitochondrie s'est révélée être un régulateur clé dans la décision de vie ou de mort. Des travaux ont montré que la mitochondrie ne se contentait pas seulement de recevoir et d'intégrer des signaux de mort, mais qu'elle était également capable d'en générer.

Le relargage des protéines mitochondriales apoptogènes

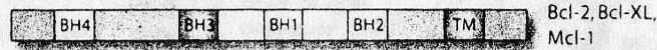
La mitochondrie dispose de plusieurs armes pour induire la mort cellulaire. Parmi elles, l'un des mécanismes les mieux caractérisés est le relargage dans le cytosol des protéines pro-apoptotiques qu'elle contient (**figure 1**). Les mitochondries sont des organelles très spécialisés composés d'une membrane externe (ME) séparée d'une membrane interne (MI) par un espace intermembranaire (EIM). C'est dans cet EIM que sont contenues de nombreuses protéines impliquées dans l'induction de la mort cellulaire. Ces

Figure 1 Le relargage des protéines pro-apoptotiques.

Figure 2 Les membres de la famille Bcl-2.

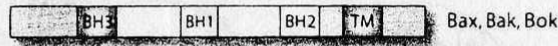
Les membres de la famille Bcl-2 sont de puissants régulateurs de la mort cellulaire capables de moduler la perméabilité de la mitochondrie. En fonction de leurs domaines BH (*Bcl-2 Homology domain*), ils sont classés en deux catégories : les membres pro- et anti-apoptotiques. La plupart des membres de la famille Bcl-2 possèdent un domaine transmembranaire (TM) nécessaire à leur insertion dans les membranes intracellulaires.

Membres anti-apoptotiques



Membres pro-apoptotiques

sous-famille "BH multi-domain"



sous-famille "BH3-only"



protéines incluent aussi bien des effecteurs de la mort indépendante des caspases que des activateurs des caspases. Après un stimulus apoptotique, le cytochrome c – normalement impliqué dans la production d'énergie – va sortir de la mitochondrie, former un complexe avec les protéines Apaf-1 et procaspase-9 en présence d'ATP pour constituer l'apoptosome (3). Ce complexe de haut poids moléculaire peut alors activer les caspases effectrices -3 et -7 déclenchant une cascade protéolytique qui conduit au démantèlement de la cellule. L'apoptosome semble être sous la régulation des protéines de la famille IAP (*Inhibitor of Apoptosis*). Ces protéines possèdent la capacité de se lier aux formes activées des caspases-9 et -3 (4), inhibant de cette façon leur activité protéolytique qui pourrait être dangereuse dans une cellule saine. Lors de l'apoptose, les effets inhibiteurs des IAP vont être antagonisés par les protéines mitochondriales Smac/DIABLO (5) et Omi/HtrA2 (6) relarguées hors de la mitochondrie. Des travaux récents ont montré que la protéine Omi/HtrA2 pouvait jouer un rôle direct dans la mort indépendante des caspases grâce à son activité de protéase à sérine.

Outre ces protéines capables de moduler l'activation des caspases, des protéines telles que AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) et Endonucléase G (Endo G) sont également relarguées hors de la mitochondrie lors de la MCP. Ainsi, la flavoprotéine AIF transloque de la mitochondrie vers le noyau où elle a été incriminée dans la fragmentation de haut poids moléculaire de l'ADN (50 Kb) ainsi que dans la condensation périphérique de la chromatine observée dans la MCP de type I (7). La protéine mitochondriale Endo G participe également en coopération avec AIF à la condensation de la chromatine et à la dégradation du noyau (8). Bien que la participation relative de chaque facteur dans la fragmentation de haut poids moléculaire et/ou oligonucléosomale de l'ADN ne soit pas claire, les activités combinées d'AIF et Endo G fournissent un moyen efficace de détruire le noyau cellulaire lors de la MCP.

Comment cela fonctionne-t-il ?

Si le relargage de ces facteurs mitochondriaux est d'une importance critique dans la progression de la mort cellulaire, les mécanismes précis de leur sortie restent controversés. Différents modèles ont été proposés et

pourraient coexister, impliquant pour la plupart la perméabilisation de la ME mitochondriale. Une des hypothèses postule l'ouverture d'un pore multiprotéique mitochondrial appelé PTP (*Permeability Transition Pore*) composé majoritairement de la porine VDAC (*Voltage Dependent Anion Channel*) de la ME et de la protéine ANT (*Adenine Nucleotide Translocator*) insérée dans la MI. L'ouverture de ce pore provoquerait un gonflement de la matrice mitochondriale conduisant à la rupture de la ME et au relargage aspécifique des protéines apoptogènes contenues dans l'EIM. Une variation de ce modèle propose une coopération des protéines de la famille Bcl-2 (*B-cell leukemia/lymphoma-2*) et plus particulièrement Bax avec les protéines ANT et VDAC pour favoriser l'ouverture du pore.

Un dernier modèle suggère plutôt la formation d'un pore dans la ME par certaines protéines de la famille Bcl-2. Les membres de cette famille sont de puissants régulateurs de la mort cellulaire qui peuvent influencer positivement ou négativement la perméabilité de la mitochondrie (9). La figure 2 montre les membres pro- et anti-apoptotiques de cette famille, les derniers possédant le domaine protecteur BH4 (BH pour «*Bcl-2 Homology*»). L'homologie de séquence entre certains membres de la famille de Bcl-2 et des toxines bactériennes capables de former des canaux membranaires, telles que les colicines ou encore la toxine diphérique, a fourni la première preuve de la régulation de la perméabilité mitochondriale par les protéines de la famille Bcl-2. Des études ultérieures sur la structure de Bax, Bak et la forme tronquée de Bid (membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2) ont permis de révéler cette même capacité à former des canaux. L'activation de Bax ou Bak par les protéines «*BH3-only*» comme Bid ou Bim permet leur oligomérisation dans la ME et le relargage subséquent des protéines pro-apoptotiques contenues dans l'EIM (10). Ces altérations sont sous le contrôle négatif des protéines anti-apoptotiques de la famille comme Bcl-2 et Bcl-X_L (11). Des travaux récents ont montré un nouveau rôle au niveau mitochondrial de la protéine p53. Cette protéine joue un rôle prépondérant dans la régulation de la MCP et dans le maintien de l'intégrité du génome. p53 est l'un des plus puissants suppresseurs de tumeurs, le gène est d'ailleurs muté dans près de la moitié des cas de cancers humains. En réponse à un stress génotoxique, p53 induit l'apoptose ou l'arrêt du cycle cellulaire, empêchant ainsi la prolifération de cellules ayant un

(3) XJ Jiang, X Wang (2004) *Annu. Rev. Biochem.* 73, 87-106
 (4) SB Bratton et al. (2001) *EMBO J.* 20, 998-1009
 (5) C Du et al. (2000) *Cell* 102, 33-42
 (6) AM Verhagen et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 445-54
 (7) SA Susin et al. (1999) *Nature* 397, 441-6
 (8) LY Li et al. (2001) *Nature* 412, 95-p9
 (9) S Cory, et al. (2003) *Oncogene* 22, 8590-607
 (10) R Eskes et al. (2000) *Mol Cell Biol.* 20, 929-35
 (11) L Scorrano, S.J. Korsmeyer (2003) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 304, 437-444

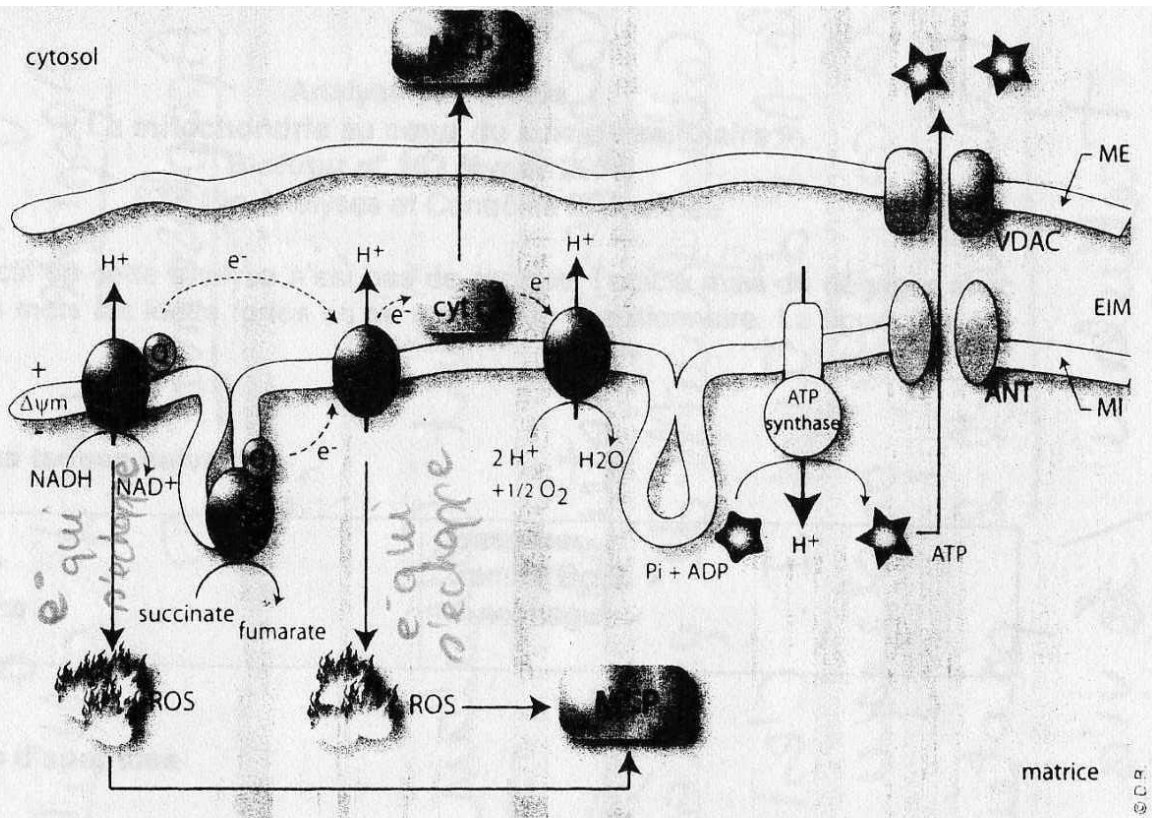


Figure 3 La chaîne respiratoire mitochondriale et la production de ROS.

L'évasion d'électrons de la chaîne respiratoire, souvent au niveau des complexes I et III, conduit à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ces ROS, très nocifs pour la cellule, sont impliqués dans les trois types de MCP (Q : coenzyme Q ; cyt c : cytochrome c ; e⁻ : électron ; voir le texte pour les autres abréviations).

ADN endommagé. Lorsqu'elle est stabilisée, p53 va induire la transcription de nombreux gènes pro-apoptotiques tels que *puma*, *nox4*, *bax*, *apaf-1*, *killer/DR5* ou encore *fas*. Une équipe américaine a récemment montré que p53 pouvait engager un processus apoptotique en activant directement la protéine Bax pour perméabiliser la mitochondrie. p53 pourrait également faciliter le relargage des protéines à «multi-domain BH» et «BH3-only» séquestrées et inactivées par Bcl-X_L (12).

Fission, fusion... et mort cellulaire

Le remodelage de la mitochondrie pendant la mort cellulaire pourrait constituer une interface entre voies de mort et régulation normale de la morphologie des mitochondries. Les mitochondries s'organisent en effet en un réseau dynamique. Ce réseau interconnecté constitue un système très efficace pour délivrer de l'énergie entre les différentes aires de la cellule. Ainsi les mitochondries subissent des épisodes continus de fission et de fusion selon les besoins énergétiques de la cellule. Des travaux récents ont montré que les protéines de la famille des dynamines contrôlant la dynamique mitochondriale jouaient également un rôle important dans le contrôle de la MCP (13). La diminution spécifique de l'expression des protéines Drp1 et Fis1 impliquées dans la fission mitochondriale inhibe la mort cellulaire alors que la diminution de la protéine Opa1 impliquée dans la fusion mitochondriale l'augmente.

Interruption de la chaîne de transport des électrons et production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS)

La chaîne respiratoire mitochondriale composée de quatre complexes couplés à l'ATP synthase *f₀f₁* fonctionne grâce au transfert d'électrons du NADH ou du succinate à l'oxygène moléculaire. Le transport des électrons le long de la chaîne respiratoire s'accompagne d'une exclusion de protons de la matrice mitochondriale vers l'EIM. Ce gradient électrochimique génère un potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\psi_m$) nécessaire à l'activité ATP synthase mais aussi à l'importation des protéines mitochondriales ou à la régulation du transport des métabolites. Le potentiel transmembranaire mitochondrial est souvent utilisé comme un indicateur de la viabilité cellulaire puisque son interruption a des répercussions dramatiques sur la respiration mitochondriale, la production d'énergie et par conséquent la survie de la cellule.

Il arrive fréquemment qu'un électron s'échappe de la chaîne respiratoire, le plus souvent au niveau des complexes I et III (14). La réaction de l'électron renégat avec l'oxygène moléculaire va engendrer des éléments instables tels que les anions superoxydes ou les radicaux hydroxyles qui, si ils ne sont pas éliminés rapidement par la cellule, vont causer des dommages très importants (peroxydation des lipides, lésions de l'ADN) (figure 3). Des niveaux disproportionnés de ROS peuvent induire soit un renouvellement physiologique des organelles par autophagie, soit une destruction complète de la cellule *via* un ou plusieurs types de MCP. Il a ainsi été montré que la production de ROS causée par la faiblesse de la chaîne de transport des électrons pouvait induire des altérations de la ME et le relargage du cytochrome c. Selon sa localisation, cette protéine joue donc un double rôle. Lorsqu'elle est contenue dans la mitochondrie, elle participe à la chaîne de transport des électrons et donc à la survie de la cellule alors que lorsqu'elle est localisée

- (12) JE Chipuk *et al* (2004) *Science* 303, 1010-4
- (13) M Karbowski, R.J. Youle (2003) *Cell Death Differ* 10, 870-80
- (14) JE Ricci *et al* (2003) *Cell Death Differ* 10, 488-92

dans le cytosol, elle participe à la constitution de l'apoptosome et au déclenchement de la cascade apoptotique (14). Des travaux récents ont montré qu'une sous-unité du complexe I était clivée spécifiquement par certaines caspases lors de l'apoptose (15) ce qui provoquerait, dans certains types de mort cellulaire, la chute du $\Delta\Psi_m$ et la génération des ROS.

La production d'ATP

L'interruption de la chaîne de transport des électrons empêche la production d'ATP, provoquant des perturbations importantes de l'état bio-énergétique de la cellule difficilement compatibles avec la survie. L'inhibition de la production d'ATP est observée à la fois dans la MCP de type I et III. Néanmoins, ce phénomène se produit relativement tard dans la MCP de type I puisque le déroulement du processus apoptotique nécessite de l'énergie à de nombreuses étapes (formation de l'apoptosome, hydrolyse de macromolécules...). Au contraire, la MCP de type III se caractérise par une chute très précoce de la synthèse d'ATP et se déroule dans des conditions de faible niveau d'ATP cytosolique. Le niveau d'ATP semble être un facteur déterminant dans la décision du type de mort qui sera engagé. Ainsi la staurosporine (un inhibiteur général des kinases) qui induit normalement une mort cellulaire de type I va induire une mort de type III dans des cellules dépletées en ATP (16).

Les différentes étapes qui gouvernent la MCP de type II nécessitent également de l'énergie. Normalement, l'autophagie est un processus impliqué dans le renouvellement physiologique des organelles âgés ou endommagés, participant au maintien de l'équilibre entre synthèse et dégradation protéique (17). Les signaux qui induisent le basculement d'une dégradation normale des organelles vers une destruction autophagique complète de la cellule ne sont toujours pas connus. Cependant, étant donné la séquestration préférentielle des mitochondries dans les vacuoles autophagiques, il semble plausible que celles-ci puissent dicter l'importance de la dégradation autophagique.

Guimarães et Linden suggèrent que la cellule pourrait répondre de façon graduelle à la perméabilisation transitoire de la mitochondrie (18). Un nombre limité de mitochondries perméabilisées induirait la dégradation autophagique des organelles altérées, alors qu'une perméabilisation plus importante induirait la mort de la cellule par apoptose due au relargage cytoplasmique de molécules telles que AIF ou cytochrome c. Enfin, une perméabilisation généralisée des mitochondries promouvrait une mort cellulaire par nécrose, due à un découplage total de la chaîne de transport des électrons et une hydrolyse incontrôlée de l'ATP par l'ATP synthase mitochondriale.

Conclusions et perspectives

Il semble donc qu'il n'y ait pas une mais plusieurs façons pour la cellule de mourir. Dans tous les cas, la mitochondrie joue un rôle central dans le suicide cellulaire (figure 4). Cet organelle dispose de plusieurs armes pour tuer la cellule : relargage de protéines apoptogènes, production de ROS et interruption de la chaîne respiratoire et de la production d'ATP.

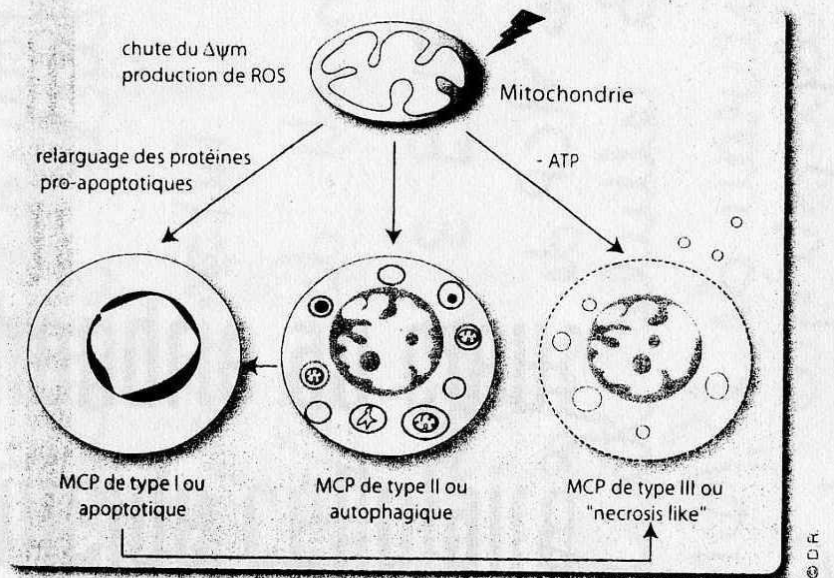


Figure 4 La mitochondrie au cœur de la mort cellulaire programmée.

Des études récentes suggèrent une interdépendance plus qu'une indépendance des différentes voies de MCP. Ainsi, l'apoptose et la nécrose paraissent bien plus étroitement liées que ce que l'on pensait auparavant, lorsqu'elles définissaient la dichotomie de la mort cellulaire. Il a même été montré que la nécrose pouvait se substituer dans certaines conditions à l'apoptose lors du développement embryonnaire. De façon similaire, les relations entre l'autophagie et l'apoptose se sont révélées être assez complexes. Certaines drogues induisent simultanément une MCP par apoptose et par autophagie. Si l'utilisation précoce d'inhibiteurs de l'autophagie, comme la 3-méthyladenine, inhibe la formation des vacuoles autophagiques, elle inhibe aussi la mise en place de l'apoptose (19). Ces résultats semblent indiquer que les étapes précoces de la MCP de type II pourraient être parfois requises pour la MCP de type I. L'un des exemples les plus intéressants de l'interaction entre les trois types de MCP est la réponse des cellules MCF-7 au traitement par le tamoxifène (20). En effet, selon la dose de la drogue utilisée, les trois types de mort peuvent être observés. Ainsi, l'activation simultanée de plusieurs voies de mort cellulaire pourrait constituer un moyen efficace de détruire la cellule. La plupart des traitements utilisés en clinique pour combattre les cellules cancéreuses provoque des altérations génétiques et une élimination des cellules par une MCP de type I. Cependant, il arrive fréquemment que les cellules cancéreuses présentent des anomalies qui les rendent résistantes à la mort dépendante des caspases (mutation de p53, surexpression de Bcl-2...). Pour pallier ces résistances, de nouvelles molécules sont actuellement testées en chimiothérapie pour induire une MCP de type III.

Les interactions sophistiquées entre les types de mort constituent la meilleure arme dont nous disposons pour tuer les cellules tumorales. Si les mécanismes régulant la MCP de type I ont été beaucoup étudiés, peu de choses sont connues sur la régulation de la MCP de type II et III. La compréhension des mécanismes qui permettent d'activer et de moduler les différentes voies de mort devrait constituer un enjeu majeur de la recherche contre le cancer dans les prochaines années. ●

- (15) JE Ricci *et al.* (2004) *Science* 117, 773-86
 (16) M Leist *et al.* (1997) *J. Exp. Med.* 185, 1481-6
 (17) E Ogier-Denis, P Codogno (2003) *Biochim. Biophys. Acta* 1603, 113-28
 (18) CA Guimarães, R Linden (2004) *Eur. J. Biochem.* 271, 1638-50
 (19) L Jia *et al.* (1997) *Br. J. Haematol.* 98, 673-85
 (20) W Bursch *et al.* (1996) *Carcinogenesis* 17, 1595-607