



Faculté de médecine

**Centre de recherches en
neurobiologie cellulaire et moléculaire**

**Contribution à l'étude la mort neuronale : effets de deux neurotoxines
endogènes et de ligands synthétiques du PBR.**

*Mémoire présenté en vue de l'obtention d'un grade de
Docteur en sciences biomédicales expérimentales*

Dr. Grégory Hans

Année académique 2004-2005

Promoteurs : Pr. J.-M. Rigo
Pr. G. Moonen

Remerciements

Son cours de physiologie restera un fondement de ma pratique professionnelle. Il m'a aussi donné le goût de la recherche biomédicale et est l'instigateur de ce travail qui sans lui, n'aurait jamais vu le jour. Ses qualités humaines ont également été précieuses tout au long de mon parcours. Il a su encourager mes projets et je n'oublierai pas sa capacité d'écoute dans les moments difficiles. Je tiens ici à exprimer ma profonde reconnaissance au Professeur Moonen.

Durant les années passées au laboratoire, deux personnes ont été particulièrement présentes à mes côtés. Je remercie le Professeur Jean-Michel Rigo pour la direction de mon projet de thèse, ses nombreux conseils scientifiques et son aide lors de la rédaction des articles. Son humanisme restera aussi gravé dans ma mémoire. L'expertise technique de Madame Patricia Ernst-Gengoux, a permis la réalisation de ce travail. Elle aussi, a toujours été à l'écoute et bonne conseillère. Je tiens ici à leurs témoigner mon amitié.

Je voudrais également adresser mes remerciements au Dr. Pierre Robe. Je garderai un souvenir agréable des soirées, des nuits et des jours de congé que nous avons passés ensemble au laboratoire. Je retiendrai sa vivacité ainsi que son intérêt pour le travail d'autrui. Il m'a transmis une partie de ses compétences expérimentales.

Je remercie le Dr. Sabine Wislet-Gendebien et Mr François Lallemand pour leur présence, leur aide et leurs précieux conseils. Nos échanges ont toujours été fructueux, et sans leur collaboration, la réalisation de ce travail aurait été pénible.

Les Dr. Brigitte Malgrange et Shibeshih Belachew m'ont communiqué leur dynamisme et leur expérience. Je les remercie pour leur rigueur, leur aide et leurs encouragements. Le Dr. Belachew m'a également beaucoup épaulé lors de mon séjour dans le service de neurologie.

Durant ces deux années, j'ai eu l'occasion de côtoyer d'autres personnes. Pour leurs conseils, leur aide et les bons moments passés ensemble, je remercie Melle Patricia Piscicelli, le Dr. Ingrid Breuskin, le Dr. Laurent Nguyen, le Dr. Jessica Crommen, le Dr. Pierre Leprince, le Dr. Bernard Rogister, le Dr. Jean-Marie Mangin, Mme Murielle Wouters, Mme Arlette Brose, le Dr. Rachelle Franzen-Chariot, Mr Bernard Coumans et le Dr. Alain Chariot.

Table des matières

REMERCIEMENTS	2
TABLE DES MATIÈRES	3
CHAPITRE I : INTRODUCTION AUX MECANISMES DE LA MORT CELLULAIRE	5
I. GENERALITES	6
II. LA MORT CELLULAIRE PAR APOPTOSE	7
II.1. INTRODUCTION	7
II.2. LES CASPASES	8
II.3. L'ACTIVATION DE L'APOPTOSE PAR LES RECEPTEURS DE MORT MEMBRANAIRES	11
II.4. L'ACTIVATION DE L'APOPTOSE PAR LA MITOCHONDRIE	13
II.5. LE RETICULUM ENDOPLASMIQUE ET L'APOPTOSE	18
II.6. LA REPONSE APOPTOTIQUE DECLENCHEE PAR LES ALTERATIONS GENOMIQUES	20
II.7. L'ACTIVATION DE L'APOPTOSE PAR LES MAPKINASES (MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASES)	20
II.8. LE STRESS OXYDATIF ET L'APOPTOSE	21
III. LA MORT CELLULAIRE PAR NECROSE	22
III.1. PRINCIPES DE LA MORT NECROTIQUE	22
III.2. LE ROLE DE LA MITOCHONDRIE DANS LA NECROSE	22
III.3. CAS PARTICULIER DU SYSTEME NERVEUX : L'EXCITOTOXICITE	23
III.4. LES CASPASES DANS LA NECROSE	24
IV. BUTS DU TRAVAIL	24
PUBLICATION I : MOLECULAR PATHWAYS INVOLVED IN APOPTOTIC CELL DEATH IN THE INJURED COCHLEA: CUES TO NOVEL THERAPEUTIC STRATEGIES	26
CHAPITRE II : CONTRIBUTION A L'ETUDE DU MECANISME D'ACTION DE DEUX NEUROTOXINES ENDOGENES : LA N-BUTYL-BETA-CARBOLINE-3-CARBOXYLATE ET LE FACTEUR NEUROTOXIQUE D'ORIGINE ASTROCYTAIRE	27
I. INTRODUCTION	28
II. LES β-CARBOLINES ET LA NEUROTOXICITE DE LA β-CCB	28
II.1. LES COMPOSES HARMANE ET NORHARMANE	29
II.2. LA β CCB	29
III. LE FACTEUR NEUROTOXIQUE D'ORIGINE ASTROCYTAIRE (NAF)	36
III.1. INTRODUCTION : LA FONCTION ASTROCYTAIRE	36
III.2. LE FACTEUR NEUROTOXIQUE D'ORIGINE ASTROCYTAIRE : PROPRIETES ET ELEMENTS D'IDENTIFICATION (PUBLICATION 3)	37

III.3. PARTIE II : PERSPECTIVES	40
<u>PUBLICATION II : β-CARBOLINES INDUCE APOPTOSIS IN CULTURED CEREBELLAR GRANULE NEURONS VIA THE MITOCHONDRIAL PATHWAY</u>	42
<u>PUBLICATION III : MODULATION OF NEURONAL SURVIVAL AND EXCITABILITY BY AN ASTROGLIA-DERIVED FACTOR</u>	43
<u>CHAPITRE III : CONTRIBUTION A L'ETUDE DU MECANISME DE LA TOXICITE DES LIGANDS DU RECEPTEUR PERIPHERIQUE/MITOCHONDRIAL DES BENZODIAZEPINES</u>	44
I. INTRODUCTION	45
I.1. STRUCTURE MOLECULAIRE ET LOCALISATION CELLULAIRE DU PBR	45
I.2. FONCTIONS PRESUMEEES DU PBR	45
I.3. LES LIGANDS SYNTHETIQUES DU PBR	48
I.4. LES LIGANDS ENDOGENES DU PBR	49
II. CONTRIBUTION PERSONNELLE : ETUDE DU MECANISME D'ACTION DES LIGANDS DU PBR	50
II.1. OBJECTIFS	50
II.2. RESUME DES RESULTATS ET DISCUSSION (PUBLICATION 4)	50
II.3. CONCLUSIONS	56
<u>PUBLICATION IV : PERIPHERAL BENZODIAZEPINE RECEPTOR (PBR) LIGANDS INDUCE CELL DEATH THROUGH A PBR-INDEPENDENT MECHANISM</u>	58
<u>CONCLUSIONS GENERALES</u>	59
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	64

**Chapitre I : Introduction aux mécanismes de la mort
cellulaire**

I. Généralités

La mort cellulaire est avant tout un processus physiologique. Elle est indispensable à de nombreuses activités de l'organisme. Ainsi, au cours du développement, elle permet le façonnement de certains organes¹ de même que l'élimination de cellules immunitaires auto-réactives². Chez l'adulte, elle est indispensable au renouvellement des tissus où les cellules les plus anciennes sont remplacées par des cellules nouvellement formées³. Toutefois, lorsqu'elle survient en excès suite à une agression, elle peut comporter de nombreuses conséquences pathologiques. Par exemple, l'ischémie cérébrale s'accompagne d'une libération synaptique massive de glutamate qui provoque la mort des neurones au terme d'une cascade d'évènements biochimiques appelée excitotoxicité⁴. Un autre exemple est le diabète de type I, ou diabète juvénile, qui est la conséquence de la perte des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. A l'inverse, un défaut de mort cellulaire peut également contribuer au développement d'affections dysimmunitaires ou tumorales^{5;6}.

Deux mécanismes principaux de mort cellulaire sont habituellement décrits, l'apoptose et la nécrose. L'apoptose, décrite par Kerr en 1972, correspond à une mort caractérisée morphologiquement par une condensation nucléaire, une contraction puis une fragmentation de la cellule en vésicules appelées corps apoptotiques⁷. Son exécution requiert une consommation d'ATP et une synthèse protéique. Au sein des tissus, les corps apoptotiques sont phagocytés par les cellules avoisinantes. A l'échelon moléculaire, de nombreuses cascades biochimiques peuvent être responsables de la mort par apoptose. En ce qui concerne la nécrose, elle est généralement décrite comme une perte de l'homéostasie ionique et implique la survenue d'un afflux massif de calcium vers le cytosol. L'activation de nombreuses protéases et nucléases dépendantes du calcium contribue à la dégradation cellulaire. La morphologie des cellules en nécrose est très différente de celle des cellules en apoptose et se caractérise par un œdème cellulaire suivi d'une rupture de la membrane plasmique (Figure 1). Dans le tissu qui en est le siège, cette lyse déclenche une réaction inflammatoire⁸.

A l'heure actuelle, de nombreux auteurs pensent qu'opposer mort cellulaire par nécrose et mort par apoptose est arbitraire et inutile. Ils considèrent ces deux mécanismes comme les extrémités d'un continuum^{9;10}.

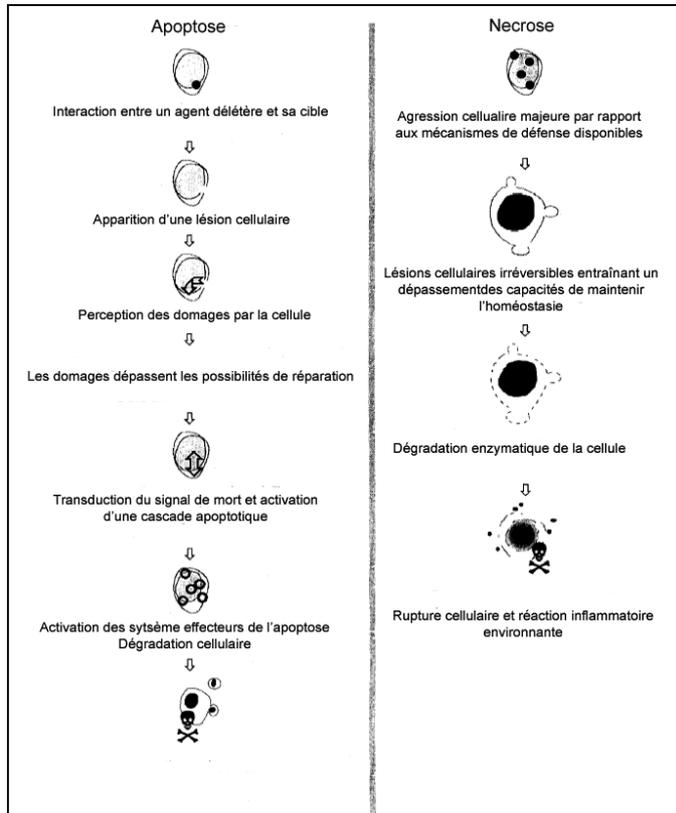


Figure 1: Représentation schématique de l'apoptose et de la nécrose. D'après M. Raffray et G.M. Cohen, Pharmacology & Therapeutics, 1997.

L'apoptose a initialement été décrite comme le mécanisme de la mort cellulaire physiologique, et la nécrose comme caractéristique des situations pathologiques. Cette conception est cependant simpliste. La mort cellulaire physiologique, également appelée mort cellulaire programmée, et la mort cellulaire par agression peuvent présenter des caractéristiques nécrotiques ou apoptotiques selon le type cellulaire et les circonstances au cours desquelles elles surviennent. Ainsi, pendant le développement de l'organisme, les exemples de mort cellulaire physiologique par nécrose ne sont pas rares¹, tout comme il est fréquent qu'une cellule présente toutes les caractéristiques d'une mort apoptotique dans un tissu ischémié¹¹. La distinction entre la mort cellulaire « physiologique ou programmée » et la mort cellulaire « accidentelle ou par agression », ne permet donc pas de

préjuger des mécanismes biochimiques en cause¹².

Ce premier chapitre est consacré à la description des principaux mécanismes biochimiques pouvant conduire à la mort cellulaire par apoptose et par nécrose.

II. La mort cellulaire par apoptose

II.1. Introduction

La mort cellulaire par apoptose est un phénomène extrêmement complexe et régulé qui aboutit *in fine* à la condensation du noyau et à la fragmentation de la cellule en corps apoptotiques. Elle peut être déclenchée de façon génétiquement programmée comme c'est le cas au cours du développement, ou par la perception d'un signal de mort au niveau d'un organite ou d'un récepteur cellulaire. Plusieurs cascades d'événements biochimiques mènent à l'apoptose. Elles sont recrutées de manière différentielle ou complémentaire en fonction du stimulus déclencheur, des conditions environnantes et du type cellulaire. Les paragraphes

suivants sont consacrés à la description des principaux acteurs des cascades apoptotiques et de leurs mécanismes d'activation.

II.2. Les caspases

II.2.1. Structure moléculaire et mécanisme d'activation

Les caspases sont des enzymes appartenant à la famille des cystéine aspartate protéases qui jouent un rôle prépondérant au cours de nombreux processus apoptotiques. Le site de clivage au niveau duquel ils opèrent est très spécifique. Il est précédé par un résidu aspartate et une séquence de reconnaissance d'au moins quatre acides aminés situés sur son extrémité amino-terminale¹³. Dans le cytosol des cellules vivantes, les caspases sont présentes sous la forme de

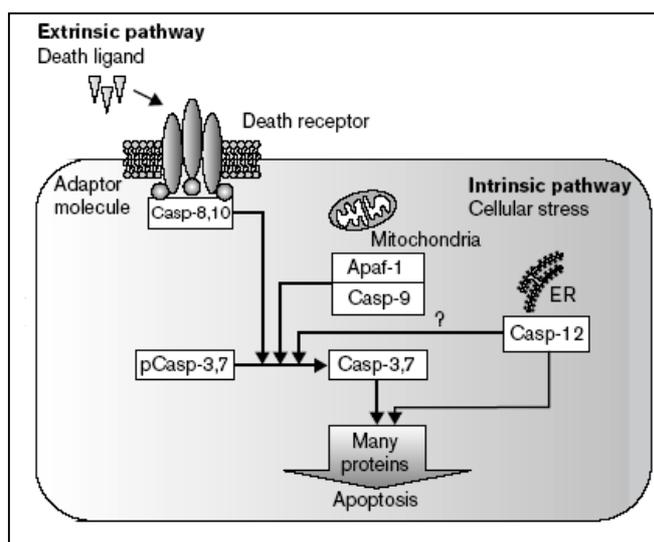


Figure 2: Schéma général des voies d'activation des caspases. D'après M.G. Grütter, *Current opinion in structural biology*, 2000.

pro-enzymes dont le poids moléculaire est d'environ 50 kDa. La structure moléculaire de ces pro-enzymes comprend un pro-domaine, situé à l'extrémité amino-terminale, une grande sous-unité (~20 kDa) et une petite sous-unité (~10 kDa)¹⁴. L'activation des caspases commence par un clivage protéolytique de ces trois domaines. La grande et la petite sous-unités forment ensuite un hétérodimère qui possède l'activité catalytique.

On distingue généralement deux groupes de caspases, les caspases initiatrices (caspases-8, -9 et -12) et les caspases effectrices (caspases-3, -6 et -7). Le mécanisme d'activation des caspases initiatrices est complexe. Il fait généralement intervenir un cofacteur qui joue le rôle de « pont moléculaire » entre la perception du signal de mort au niveau d'un organite ou d'un récepteur et l'activation de la caspase. La fixation de plusieurs molécules de pro-caspase au niveau du cofacteur crée une élévation de la concentration locale en pro-enzyme et permet son activation par autocatalyse¹⁵. Les mécanismes précis d'activation des différentes caspases initiatrices sont détaillés plus loin (II.3-4). La figure 2 résume les caractéristiques des trois principales voies d'activation de ces caspases. La caspase 8 est activée par les « récepteurs de mort » situés au niveau de la membrane plasmique¹⁶. L'activation de la caspase 9 est consécutive à la libération dans le cytosol de facteurs pro-apoptotiques normalement confinés dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie¹⁷. Enfin, l'activation de la caspase 12 fait suite à un stress du réticulum endoplasmique, c'est-à-dire à l'accumulation anormale de calcium ou de protéines anormales dans cet organite¹⁸. Les caspases initiatrices activent ensuite les caspases effectrices qui dégradent les constituants cellulaires et provoquent la mort.

II.2.2. Régulation de l'activité des caspases

Plusieurs facteurs régulent l'activation et l'activité des caspases et participent ainsi au contrôle de la mort et de la survie cellulaire.

II.2.2.1. Régulation de la transcription des gènes codant les caspases

L'activation des caspases peut tout d'abord être modulée au niveau transcriptionnel. En effet, dans un organisme, toutes les cellules n'expriment pas les pro-enzymes de la famille des caspases avec la même intensité. On peut donc imaginer que plus le niveau d'expression est faible, moins les cellules sont sensibles aux inducteurs de l'apoptose, l'inverse étant également vrai.

Ainsi, des cytokines, dont certains interférons, peuvent réguler le niveau de transcription des gènes qui codent les caspases. L'interféron gamma augmentent en effet l'expression des gènes qui codent les pro-caspases-8 et -4¹⁹ et sensibilise donc les cellules à l'apoptose. Ce mécanisme participe probablement à son activité anti-tumorale²⁰. Par contre, certains neuroblastomes sont déficients en caspase-8^{20;21}. Ce déficit en activité caspase contribue à leur malignité.

II.2.2.2. Régulation de l'activité des caspases par des modifications post-traductionnelles

L'activité des caspases peut également dépendre de modifications post-traductionnelles, comme des phosphorylations. Ceci a été démontré pour la protéine kinase B/Akt²² et pour la protéine p38-mitogen-activated-protein-kinase (p38-MAPK)²³ qui phosphorylent les caspases-3 et -8 et inhibent ainsi leur activité.

II.2.2.3. Les inhibiteurs des protéines apoptotiques

Enfin, il existe des inhibiteurs physiologiques des caspases. Ces protéines, appelées IAPs (*Inhibitors of Apoptosis Proteins*), bloquent la cascade des caspases dans les cellules. Les gènes qui codent pour ces protéines ont initialement été identifiés dans le génome des baculovirus. Les IAPs facilitent en effet leur propagation en inhibant la réponse apoptotique de la cellule hôte à l'invasion virale¹⁵. Les IAPs agissent principalement en inhibant l'activité catalytique des caspases-3 et -7 activées. Par contre, elles agissent différemment au niveau de la caspase-9 : en se liant à la pro-caspase, elles en empêchent l'activation^{24;25}.

II.2.3. Fonctions des caspases effectrices

Les caspases effectrices, lorsqu'elles sont activées, procèdent à la protéolyse de très nombreuses protéines. Certains de ces clivages sont responsables des caractéristiques morphologiques typiques de la mort apoptotique. A l'heure actuelle, plus de 280 protéines ont été identifiées en tant que substrat des caspases. Toutefois, le clivage de ces substrats n'est pas constant d'un type cellulaire à l'autre et n'est pas nécessairement conservé entre les espèces. En outre, bon nombre d'entre eux n'ont vraisemblablement aucun rapport avec l'apoptose et les conséquences de leur clivage ne sont pas connues²⁶. Nous ne mentionnerons ici que les substrats dont le rôle est fondamental dans l'exécution des processus apoptotiques :

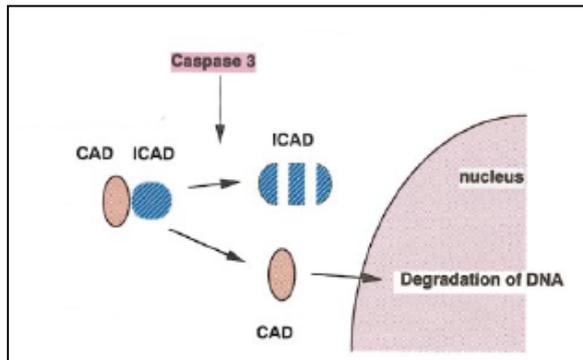


Figure 3: Clivage du DFF45 par la caspase 3 active et libération de la nucléase DFF40. D'après Nagata et col., Exp. Cell Res., 2000.

1. La **protéine ICAD/DFF45** (*Inhibitor of caspase activated DNase/DNA Fragmentation Factor 45kDa*) est une protéine de 45 kDa. Dans le cytosol des cellules vivantes, elle est liée à la nucléase CAD/DDF40 (*Caspase Activated DNase/DNA Fragmentation Factor 40 kDa*)²⁷. La caspase-3 activée clive la protéine ICAD en trois fragments, ce qui provoque la libération de la nucléase CAD. CAD

migre alors vers le noyau et y forme des oligomères capables de dégrader l'ADN (Figure 3)²⁸. L'activité nucléase de CAD s'exerce sélectivement au niveau de l'ADN internucléosomique où il reconnaît un groupe de protéines (*High Mobility Group Protein-1, -2 et 14 ainsi que Histone H1*)^{29;30}. Sachant qu'un nucléosome comprend une séquence d'ADN de 180 paires de bases, la fragmentation de l'ADN observée en présence de CAD active conduit à la formation de fragments dont la taille est un multiple de 180 pb.

2. Les caspases clivent également **de nombreuses protéines nucléaires** dont l'ADN polymérase ϵ , le facteur de réplication RFC140, PARP-1 (Poly-ADP ribose polymérase), ATM (*Ataxia Telangectasia Mutated Protein*) et la DNA PK (*DNA dependent Protein Kinase*). La plupart de ces protéines sont des enzymes de synthèse et de réparation de l'ADN²⁶.
3. De nombreuses **protéines du cytosquelette** sont aussi dégradées par les caspases. Cette dégradation contribue probablement aux modifications de l'architecture cellulaire observées lors de l'apoptose. On peut citer l'actine, la fodrine, la

cytokératine, la gelsoline, la tubuline et la vimentine mais cette liste n'est pas exhaustive²⁶.

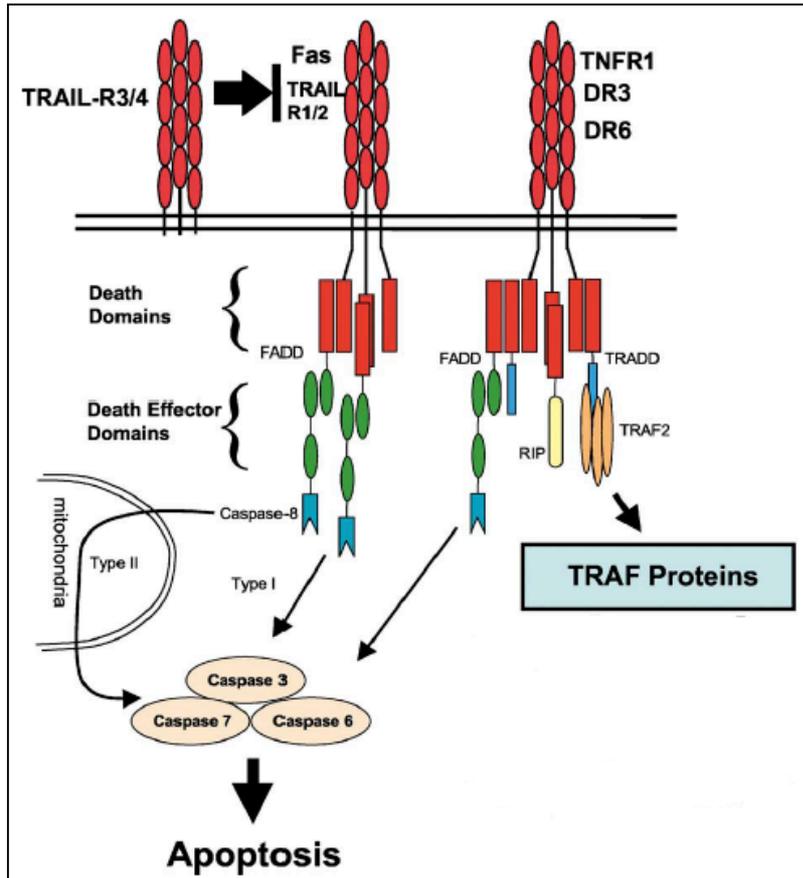
4. Parmi les autres substrats des caspases, on retrouve enfin des récepteurs membranaires et des protéines d'adhésion, des protéines impliquées dans la transduction du signal, la régulation du cycle cellulaire, la transcription des gènes et la traduction des ARN messagers (revu par Fischer et coll.)³¹.

II.3. L'activation de l'apoptose par les récepteurs de mort membranaires

Parmi les voies d'activation de l'apoptose, celle des récepteurs de mort, ou voie extrinsèque, est l'une des plus classiques.³² Les récepteurs de mort appartiennent à la superfamille des récepteurs au TNF. Cette superfamille comprend trois groupes de récepteurs qui diffèrent par la nature de leur région intracellulaire :

1. Les récepteurs du premier groupe sont caractérisés par l'existence d'un **domaine de mort (*Death Domain* ou **DD**)** au niveau de leur portion intracellulaire. Il s'agit des récepteurs TNFR, FAS/CD95, DR3/TRAMP, DR4/TRAILR1, DR5/TRAILR2 et DR6. Ce sont les récepteurs de ce groupe qui sont communément appelés récepteurs de mort (*Death Receptor* ou *DR*)³³.
2. Les récepteurs du deuxième groupe ont une portion intracellulaire qui contient un domaine **TIM (*TRAF Interacting Motif*)** qui leur permet d'interagir avec la protéine adaptatrice TRAF (*TNF Receptor Associated Factor*). Il s'agit des récepteurs TNFR-2, CD40, CD30 et p75NGFR. C'est par leur interaction avec la protéine adaptatrice TRAF que les récepteurs de ce groupe sont capables d'activer différentes voies de signalisation intracellulaire : c-Jun-N-terminal Kinase, P38 *Mitogen Activated protein Kinase*, PI3kinase...³⁴ Certaines de ces voies sont envisagées plus loin. Les effets biologiques qui résultent de leur activation sont variables : apoptose, prolifération et différenciation cellulaire.
3. Les récepteurs du troisième groupe ne possèdent **pas de domaine intracellulaire fonctionnel**. Ils sont pour cette raison appelés *Decoy Receptor*. Ils n'ont pas d'effet biologique propre. Leur fonction semble régulatrice, en modulant la quantité de ligand disponible pour interagir avec les récepteurs actifs. Il s'agit, entre autres, des récepteurs TRAIL-R3, TRAIL-R4 et DC R3³².

Dans cette introduction, nous nous limiterons à décrire la voie de signalisation des récepteurs de mort. Ces récepteurs partagent un mécanisme commun de transduction du signal. En présence de leur ligand, ils se trimérisent et fixent ensuite une protéine adaptatrice au niveau de leur domaine intracellulaire. Cette protéine adaptatrice active les mécanismes effecteurs de la signalisation, c'est-à-dire la cascade des caspases. L'ensemble constitué par le récepteur, la protéine adaptatrice et la pro-caspase forme une unité appelée DISC (*Death Inducing Signaling Complex*).



La signalisation du récepteur FAS est bien connue et représentée sur la figure 4. Le ligand de FAS (*FAS ligand*) induit d'abord la trimérisation du récepteur FAS, puis la liaison de la protéine adaptatrice FADD (*Fas Associated Death Domain*) grâce à une interaction entre le DD de la partie cytosolique de FAS et celui de la protéine FADD. A l'autre extrémité, FADD peut recruter des molécules de pro-caspase-8 ou -10 car son DED (*Death Effector Domain*) peut lier celui de la pro-caspase. La formation du DISC initiée par la signalisation du récepteur FAS provoque donc le rapprochement de plusieurs molécules de pro-caspase-8. Leur activation en caspase 8 se fait par autocatalyse¹⁶.

Figure 4: Illustration de la signalisation des récepteurs de mort. Les récepteurs sont représentés sous forme trimérique. A gauche, les récepteurs tronqués. Au centre, le récepteur FAS. A droite, le récepteur au TNF. Explications dans le texte. D'après Dempsey, *Cytokines&Growth Factors*, 2003.

D'autres protéines (non représentées sur la figure 4) peuvent être recrutées au niveau du DISC. Elles activent des voies de signalisation intracellulaire différentes des caspases. Par exemple, la protéine DAXX (*Death Associated Protein*) peut se lier au DD de FAS et y recruter ASK1 (*Apoptosis Signal regulatory Kinase 1*), ce qui active la voie JNK (c-Jun-N-terminal Kinase), une cascade de kinases dont l'activation contribue généralement à créer un environnement pro-apoptotique³³.

La voie de signalisation du récepteur au TNF est proche de celle du récepteur FAS, mais comporte une étape supplémentaire. Le DD du TNFR interagit avec le DD d'une protéine

adaptatrice TRADD (*TNF Associated Receptor Death Domain*). Le DD de TRADD s'associe ensuite avec celui de FADD. FADD est alors capable d'activer la pro-caspase-8. D'autre part, TRADD peut aussi interagir avec TRAF1, TRAF2 (*Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor*) et RIP (*Receptor Interacting Protein*) et conduire à l'activation du facteur de transcription NF- κ B et de la kinase JNK³⁴. Ces voies de signalisation sortent largement du cadre de notre travail et nous ne les détaillerons pas ici. Elles concernent principalement le système immunitaire et jouent un rôle dans l'activation de la réponse inflammatoire.

Enfin, plusieurs facteurs peuvent réguler l'activation de la caspase-8 au niveau du DISC. Nous avons déjà mentionné que l'expression de récepteurs tronqués comme le DcR3 amoindrit la quantité de *FAS ligand* effectivement disponible pour fixer le récepteur Fas actif. Certaines isoformes de la protéine kinase C, dont la PKC ζ peuvent phosphoryler FADD, et de cette façon, inhiber la formation du DISC. Enfin, certaines protéines analogues à la pro-caspase-8 comme FLIP (*FLICE Like Inhibitory Protein*) peuvent réduire son activation en formant avec la caspase-8 elle-même un hétéro-dimère inactif³⁵.

II.4. L'activation de l'apoptose par la mitochondrie

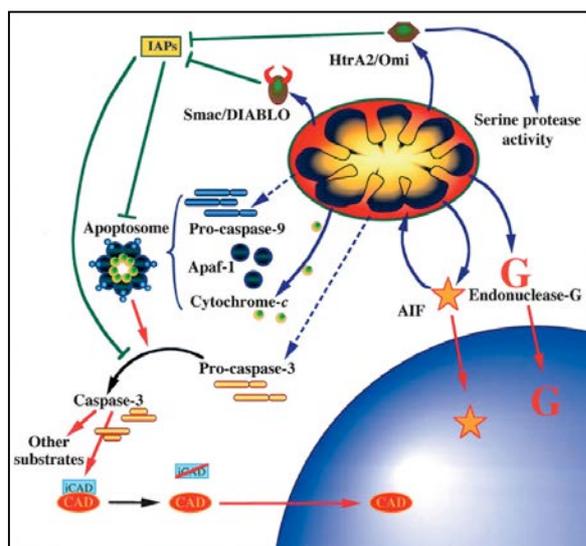


Figure 5: Fonctions des facteurs pro-apoptotiques d'origine mitochondriale. D'après L. Ravagnan, Journal of cell science, 2002.

l'apoptose.

II.4.1. Les facteurs pro-apoptotiques d'origine mitochondriale

Dans certaines conditions que nous détaillerons plus loin, la mitochondrie libère dans le cytosol des facteurs, dit « pro-apoptotiques », qui sont normalement confinés dans l'espace intermembranaire. Ces facteurs sont souvent regroupés sous le terme générique de SIMPs (*Soluble Intermembrane Mitochondrial Proteins*). Ils jouent un rôle dans l'initiation et dans l'exécution de l'apoptose. Les plus importants d'entre eux sont : le cytochrome c, l'AIF

(*Apoptosis Inducing Factor*), la protéine SMAC/DIABLO (*Second Mitochondrial Activator of Caspase*), l'endonucléase G et la protéine HtrA2/OMI³⁷ (Figure 5).

II.4.1.1. Le cytochrome c

Il s'agit du premier facteur pro-apoptotique d'origine mitochondriale à avoir été identifié. Lorsqu'il est libéré dans le cytosol, il se lie à une protéine adaptatrice appelée Apaf-1 (*Apoptosis Activation Factor-1*). En présence d'ATP, cette liaison démasque des domaines protéiques d'Apaf-1 appelés CARD (*Caspase Recruitment Domain*). Les domaines CARD d'Apaf-1 peuvent alors interagir avec des domaines CARD homologues situés sur le pro-domaine de la pro-caspase-9 et la recruter pour former un complexe protéique, l'apoptosome³⁸. La liaison de la caspase-9 au niveau de l'apoptosome provoque son activation. Les premières caspases-9 activées peuvent ensuite activer d'autres molécules de pro-caspase-9 et -3 situées à proximité^{39;40}. La formation de l'apoptosome conduit donc à l'activation de la cascade des caspases.

II.4.1.2. L'AIF (*Apoptosis Inducing Factor*)

L'AIF peut également être libéré par la mitochondrie au cours de l'apoptose. Il migre alors vers le noyau où il induit une dégradation de l'ADN en volumineux fragments (~50 kb) ainsi qu'une condensation de la chromatine. L'AIF est phylogénétiquement dérivé des flavoprotéines et possède une activité NADH oxydase et glutathion réductase⁴¹. Cependant, la manière dont il agit au niveau nucléaire n'est, à l'heure actuelle, pas connue chez les mammifères. Il est probable que son activité nucléasique n'apparaisse qu'après l'interaction avec une protéine nucléaire qui doit encore être identifiée chez les mammifères⁴². Chez *Caenorhabditis Elegans*, on sait par contre que l'AIF coopère avec l'endonucléase G pour induire la dégradation du noyau⁴³. Il est possible que la libération de l'AIF dans le noyau puisse induire l'apoptose sans aucune participation des caspases⁴⁴. Bien que de tels exemples aient été rapportés, la relation entre l'AIF et les autres acteurs de l'apoptose, en particulier les caspases, est plus complexe⁴¹. En effet, bien que l'AIF et les caspases puissent agir de façon indépendante, ils peuvent également coopérer pour induire la mort cellulaire⁴⁵.

II.4.1.3. HtrA2/OMI et smac (*Second Mitochondrial Activator of Caspases*)/DIABLO

Chez l'homme, la protéine smac est exprimée dans la plupart des tissus. DIABLO est son homologue murin. La protéine HtrA2/OMI est une sérine protéase dont la fonction mitochondriale propre n'est pas encore connue. Lorsque la membrane mitochondriale est perméabilisée, ces deux protéines sont libérées dans le cytosol où elles interagissent avec les IAPs et les empêchent d'inhiber les caspases⁴³.

Toutefois, l'interaction entre IAPs et smac/DIABLO n'est pas à sens unique. En effet, les IAPs possèdent un domaine RING qui permet la liaison à l'ubiquitine. Dès lors, lorsque smac/DIABLO est lié aux IAPs, il peut être dégradé par le protéasome, ce qui tend à maintenir un environnement anti-apoptotique⁴⁶.

II.4.1.4. L'endonucléase G

L'endonucléase G est une protéine de 33 kDa qui joue un rôle important dans la réparation et la réplication de l'ADN mitochondrial⁴³. Suite à une augmentation de la perméabilité de la membrane mitochondriale externe, l'endonucléase G peut migrer vers le noyau. Elle semble capable de s'y associer avec d'autres DNAses pour procéder à la dégradation de l'ADN⁴⁷.

II.4.2. La perméabilisation de la membrane mitochondriale

Le passage de facteurs pro-apoptotiques de l'espace intermembranaire vers le cytosol nécessite une augmentation de la perméabilité de la membrane mitochondriale externe. Cette perméabilisation peut être obtenue de diverses façons selon le type cellulaire concerné et le stimulus déclenchant l'apoptose.

II.4.2.1. Perméabilisation sélective de la membrane mitochondriale externe

La membrane mitochondriale externe joue un rôle essentiel dans la survie de la cellule en permettant la séquestration des facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux dans l'espace intermembranaire. Elle contient de nombreuses protéines aux fonctions diverses parmi lesquels on peut citer :

1. La TOM (*Translocase of the Outer Membrane*) qui permet l'importation des protéines codées au niveau du noyau.
2. La protéine *Mdm* qui unit la mitochondrie aux filaments du cytosquelette.
3. La protéine VDAC (*Voltage Dependent Anion Channel*) qui est un canal ionique.
4. Les membres de la famille de Bcl-2 qui jouent un rôle primordial dans la régulation des processus apoptotiques.

La famille de Bcl-2 (*B Cell Lymphoma 2*) est constituée d'une vingtaine de protéines, toutes caractérisées par la présence d'au moins un « domaine BH » d'homologie avec le facteur anti-apoptotique Bcl-2 (*Bcl-2 Homology Domain*). Cette famille est divisée en 3 groupes. Le premier contient cinq protéines anti-apoptotiques qui possèdent chacune quatre domaines BH (BH1-4) : Bcl-2, Bcl-x1, Mcl-11, A1 et Bcl-w. Le deuxième comprend Bax et ses homologues Bak et Bok qui contiennent trois domaines BH (BH1-3) et exercent une activité pro-apoptotique. Le troisième comprend une série de protéines également pro-apoptotiques (Bim, Bid, Bad, Noxa, Puma, Hrk) qui ne possèdent que le domaine BH3 et sont par conséquent appelées « *BH3 only* »⁴⁸.

Bax et Bak sont des éléments essentiels de la machinerie apoptotique. Dans toutes les cellules, Bak est présent sous forme d'oligomères dans la membrane mitochondriale externe. Durant la mort apoptotique, des protéines Bak supplémentaires et des protéines Bax migrent vers cette membrane, accroissant ainsi la taille des oligomères. Le mécanisme moléculaire précis par lequel Bax et Bak augmentent la perméabilité de la membrane mitochondriale externe n'est pas encore entièrement élucidé. Leur oligomérisation ainsi que leur interaction avec d'autres protéines de la membrane mitochondriale externe comme le VDAC conduit probablement à la

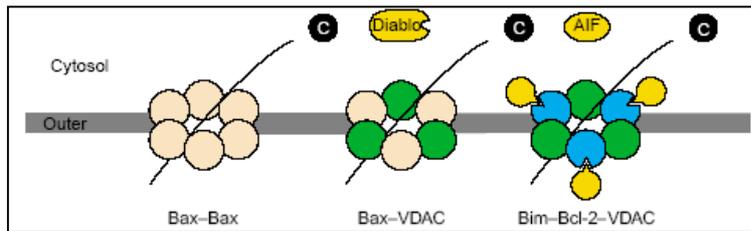


Figure 6: Représentation schématique de la perméabilisation sélective de la membrane mitochondriale externe par les membres de la famille de Bcl-2. Beige: Bax/Bax. Vert: VDAC. Bleu: Bcl-2. Jaune: Bim. D'après Adam JM et Cory S., Trends in biochemical sciences, 2001

formation de canaux perméables aux SIMPs (Figure 6)^{49;50}. La formation de ces oligomères n'a pas lieu dans les cellules vivantes en raison de l'effet inhibiteur exercé par les facteurs anti-apoptotiques également présents au niveau de la membrane mitochondriale externe (Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w)⁵¹. Au cours de l'apoptose, les « *BH3 only* », qui sont normalement complexés à d'autres protéines (Bim est fixé au cytosquelette et Bad à la protéine 14-3-3) migrent vers la membrane mitochondriale et neutralisent les facteurs anti-apoptotiques, permettant ainsi à Bax/Bak d'y former des pores⁵². Enfin, il faut encore mentionner la situation particulière de Bid parmi les « *BH3 only* ». Bid se trouve libre dans le cytosol et peut être clivé en tBid (*truncated Bid*) par la caspase 8⁵³ activée ou le granzyme B⁵⁴. Le clivage de Bid induit sa translocation dans la membrane mitochondriale externe où il induit l'oligomérisation de Bax et/ou de Bak⁵⁵⁻⁵⁸. Il peut également y former lui-même des canaux perméables aux cytochrome c^{59;60}. Bid joue donc un rôle clé en créant un lien entre la voie extrinsèque de l'apoptose et la voie mitochondriale ou intrinsèque qui peut alors jouer un rôle d'amplificateur. La caspase 8 activée peut en effet induire la libération des facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux via le clivage de Bid et amplifier ainsi l'activation des caspases.

II.4.2.2. Perméabilisation de la membrane mitochondriale interne

Contrairement à la membrane mitochondriale externe qui est perméable aux molécules de petite taille, la membrane interne n'est perméable qu'à certains ions, grâce à l'existence de transporteurs spécifiques. En outre, elle contient les quatre complexes protéiques qui forment la **chaîne des phosphorylations oxydatives**. Cette chaîne convoie les électrons depuis le NAD(P)H et le FADH₂ vers des molécules qui possèdent un potentiel d'oxydo-réduction de plus en plus élevé jusqu'à l'accepteur final, l'oxygène. L'énergie libérée lors de ce transport est utilisée pour pomper des protons depuis la matrice vers l'espace intermembranaire et créer un gradient électrochimique. Le dernier enzyme de la chaîne, l'ATP synthétase, utilise ce gradient de proton pour synthétiser l'ATP^{17;61}. La différence de potentiel électrique créée par le pompage des protons de part et d'autre de la membrane mitochondriale interne constitue le potentiel de membrane mitochondrial ou $\Delta\psi_m$.

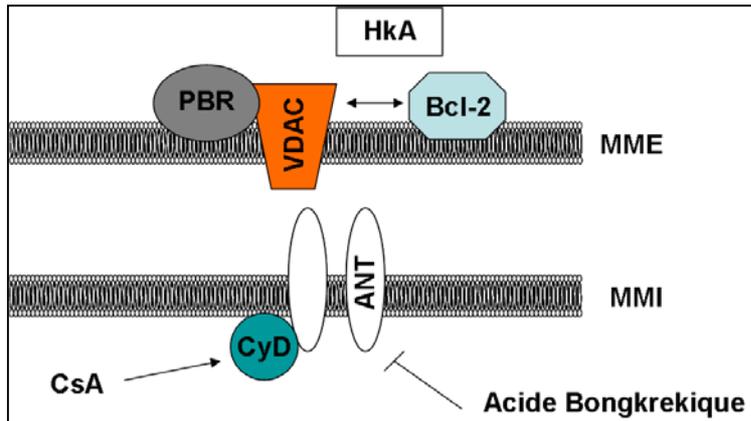


Figure 7: Représentation schématique du mPTP. MME : Membrane Mitochondriale externe. MMI : Membrane mitochondriale interne. CyD : Cyclophiline D. CsA : Cyclosporine A.

(Figure 7)⁶²⁻⁶⁴. Sa composition exacte fait encore l'objet de recherches. On pense qu'il comprend, au niveau de la membrane mitochondriale interne, l'ANT (*Adénine Nucléotide Transporter*) et la cyclophiline D (*propyl-peptidyl cis/trans isomérase*). Au niveau de la membrane mitochondriale externe, le VDAC (*Voltage Dependent Anion Channel*), le PBR (récepteur périphérique ou mitochondrial des benzodiazépines) et l'hexokinase A participent à sa formation⁶⁵. Les principaux inducteurs « physiologiques » de l'ouverture du mPTP sont le calcium et les radicaux libres. Par contre, un $\Delta\psi_m$ élevé et un pH mitochondrial acide tendent à maintenir ce pore fermé. Trois états de conductance sont décrits pour le mPTP : i) L'état fermé maintient le $\Delta\psi_m$ et permet à la mitochondrie de fonctionner normalement. ii) L'état d'ouverture massive est caractérisé par une augmentation de la perméabilité de la membrane mitochondriale à des solutés pouvant avoir une taille de 1,5 kDa. Il provoque, par afflux d'eau et de petites molécules, le gonflement de la matrice mitochondriale et la rupture de la membrane mitochondriale externe conduisant ainsi à la mort cellulaire par nécrose (voir plus loin) (Figure 8)^{50;58;66}. iii) L'état d'ouverture intermédiaire permet à des molécules d'une taille inférieure ou égale à 300 Da de passer la membrane mitochondriale interne et provoque une chute réversible du $\Delta\psi_m$ ⁶⁷. Cet état de conductance intermédiaire du mPTP revêt un intérêt particulier parce qu'il peut dépendre d'interactions entre le mPTP et certains membres pro-apoptotiques de la famille de bcl-2. En effet, de petites quantités de Bax ou de tBid peuvent induire cet état d'ouverture et provoquer une libération de facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux^{68;69}. Il est possible que cet effet soit dû à une tendance accrue de la mitochondrie à capter le calcium après l'insertion de Bax ou tBid⁷⁰. Les membres pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2 comme Bax et ses homologues peuvent donc soit perméabiliser sélectivement la membrane mitochondriale externe, soit induire l'ouverture du mPTP.

La perméabilité de la membrane mitochondriale interne dépend principalement de l'état d'ouverture d'un pore appelé **mPTP** (**mitochondrial Permeability Transition Pore**) ou mégacanal mitochondrial (*mitochondrial megachannel*). Ce pore est en fait un complexe multi-protéique situé au niveau des régions où les crêtes de la membrane mitochondriale interne viennent au contact de la membrane mitochondriale externe

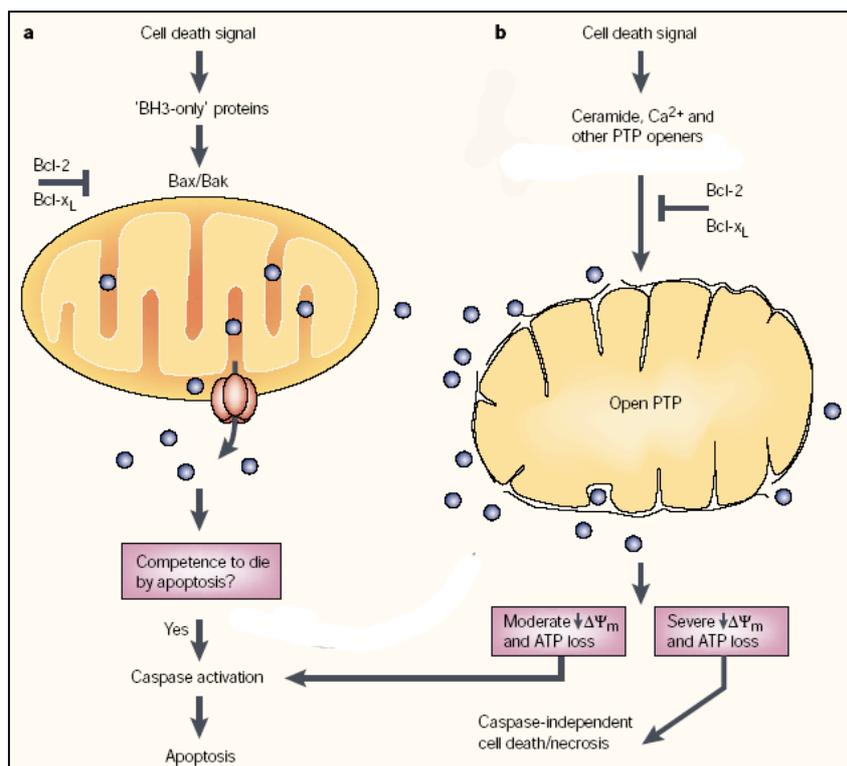


Figure 8: Illustration des deux mécanismes de perméabilisation de la membrane mitochondriale. a) Le modèle de perméabilisation sélective de la membrane externe. b) Le modèle de perméabilisation suite à l'ouverture du mPTP. D'après J.C. Martinou et D.R. Green, Nature reviews molecular and cellular biology, 2001.

sont capables d'inhiber l'ouverture, induite par l'atractyloside ou le calcium, d'un mPTP reconstitué dans des liposomes⁷³.

Le rôle du **potentiel de membrane mitochondrial** et de son évolution au cours de l'apoptose est également très complexe⁶⁷. Certains stimuli pro-apoptotiques ont une cible primitivement mitochondriale et déclenchent en premier lieu la libération des facteurs pro-apoptotiques par un mécanisme qui implique une chute, au moins transitoire, du potentiel de membrane mitochondrial. D'autres agissent initialement de façon tout à fait indépendante de la mitochondrie, mais la cascade qu'ils déclenchent conduit à l'activation d'enzymes qui altèrent le fonctionnement des chaînes respiratoires et la structure des membranes mitochondriales. La chute du $\Delta\Psi_m$ est alors observée en même temps, voire après les autres manifestations de l'apoptose⁷⁴.

II.5. Le réticulum endoplasmique et l'apoptose

Le réticulum endoplasmique (RE) est un organite clé dans la synthèse et la maturation post-traductionnelle des protéines. En outre, il joue un rôle important dans le contrôle de certains processus apoptotiques, particulièrement en réponse à l'accumulation de protéines anormales⁷⁵. En effet, cette accumulation déclenche une série de réactions adaptatives qui

Il existe également des modulateurs pharmacologiques du mPTP. La cyclosporine A et l'acide bongkréique inhibent son ouverture. La cyclosporine A se lie à la cyclophiline D et induit son interaction avec l'ANT⁷¹. L'acide bongkréique agit par liaison directe avec l'ANT. L'atractyloside induit, quant à lui, l'ouverture du pore par interaction directe avec l'ANT⁷².

Les membres anti-apoptotiques de la famille de bcl-2 peuvent également interagir avec le mPTP, du moins *in vitro* et moduler son ouverture. En effet, bcl-2 et bcl-w

visent, d'une part, à réduire la synthèse protéique et, d'autre part, en cas de stress important, à provoquer la mort cellulaire par apoptose. En plus de ces situations de synthèse protéique anormale, le RE participe, de concert avec la mitochondrie, à la régulation et à l'exécution de certains processus apoptotiques⁷⁶.

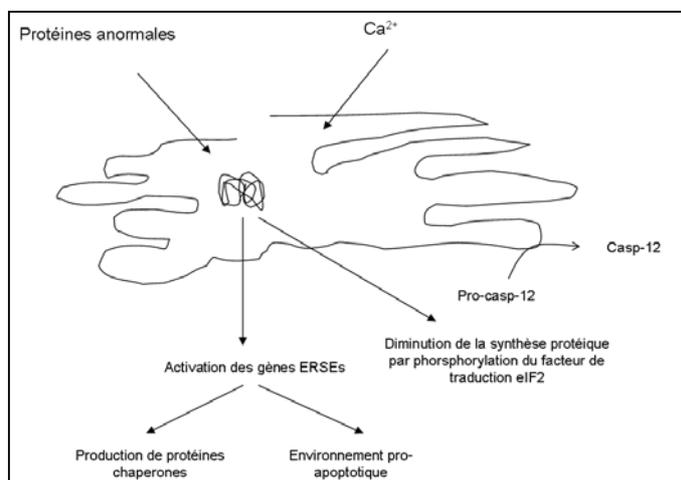


Figure 9: Représentation schématique du stress du réticulum endoplasmique. Le facteur EIF2 est un initiateur de la traduction des protéines. Sa phosphorylation réduit la synthèse protéique globale.

la synthèse protéique globale ainsi qu'une augmentation de la synthèse de protéines chaperones capables de complexer ces protéines anormales dans la lumière du RE^{76;77}.

II.5.2. L'apoptose déclenchée par le stress du réticulum endoplasmique

Lorsque le stress du RE devient trop important, outre la réponse UPR, le réticulum est capable de déclencher la mort par apoptose, en activant la caspase-12 qui est spécifiquement localisée à la surface du RE et en réduisant la transcription de plusieurs gènes anti-apoptotiques dont Bcl-2⁷⁸.

Le RE participe également à la régulation de processus apoptotiques par son rôle dans la régulation des flux calciques intracellulaires. Il est en effet le site principal de stockage du calcium dans la cellule. Le calcium y est pompé par les SERCA (*Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase*). Il peut être libéré dans le cytosol par deux types de canaux, les récepteurs à l'IP3 (Inositol triphosphate) et les canaux sensibles à la ryanodine⁷⁹. Le calcium libéré par le RE peut être capté par la mitochondrie et y moduler l'ouverture du mPTP⁷⁰. Par conséquent, tout facteur qui augmente la libération des stocks de calcium du RE déclenche une cascade apoptotique⁷⁸.

II.5.1. La réponse aux protéines anormales (Unfolded Protein Response)

Dans diverses circonstances (exposition à des espèces activées de l'oxygène, mutations géniques...), les cellules peuvent produire des protéines qui ont une propension anormale à adopter une structure fibrillaire et à former des dépôts. L'accumulation de ces protéines anormales dans la lumière du réticulum endoplasmique induit d'abord une réponse appelée UPR (*Unfolded Protein Response*). Cette réponse entraîne, au terme d'une cascade complexe d'événements moléculaires dans le détail de laquelle nous n'entrerons pas, une réduction de

II.6. La réponse apoptotique déclenchée par les altérations génomiques

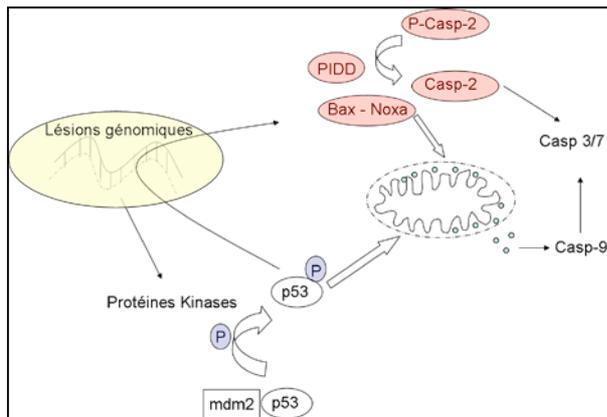


Figure 10: Conséquences des altérations génomiques sur la survie cellulaire. Explications dans le texte.

apoptotiques comme Apaf1, Fas, Bax, Noxa et PIDD (*p53 Induced Protein with Death Domain*)⁸⁰. Le facteur PIDD peut s'associer à la protéine adaptatrice RAIP1 pour former un complexe qui active la caspase 2⁸¹. P53 active aussi la voie mitochondriale de l'apoptose, mais le mécanisme précis de cette activation est encore inconnu.

Les altérations de l'ADN induites par les radiations ultraviolettes et ionisantes, ou par certains agents chimiques dont de nombreux agents anti-cancéreux, peuvent déclencher la mort cellulaire par apoptose. Ces lésions de l'ADN activent en effet des protéines kinases qui phosphorylent le facteur de transcription p53, ce qui induit sa dissociation de mdm2 (*Mouse Double Minute 2*)⁷⁸. P53 peut alors jouer son rôle de facteur de transcription et augmenter l'expression de plusieurs gènes, dits « p53 répondeurs ». Ces gènes comprennent de nombreux facteurs pro-

II.7. L'activation de l'apoptose par les MAPKinases (Mitogen Activated Protein Kinases)

II.7.1. Définition des MAPkinases

Les MAPkinases sont des protéines kinases qui sont activées au terme d'une cascade de réactions de phosphorylation. Il existe trois familles de MAPkinase : les ERK (*Extracellular Regulated Kinases*), les JNK (*c-Jun N-terminal Kinases*) et les p38.

II.7.2. Rôle des MAPkinases

Les MAPkinases agissent en phosphorylant des facteurs de transcription. Elles modulent donc *in fine* l'expression de gènes et induisent des changements dans le comportement de la cellule. L'activation des ERK provoque une augmentation de la prolifération cellulaire. Par contre, l'activation de JNK et de p38 est plus souvent associée à l'apoptose^{82;83}. En plus de leurs effets génomiques, JNK et p38 peuvent également phosphoryler d'autres substrats dont Bax et p53.

II.7.3. L'activation des MAPkinases

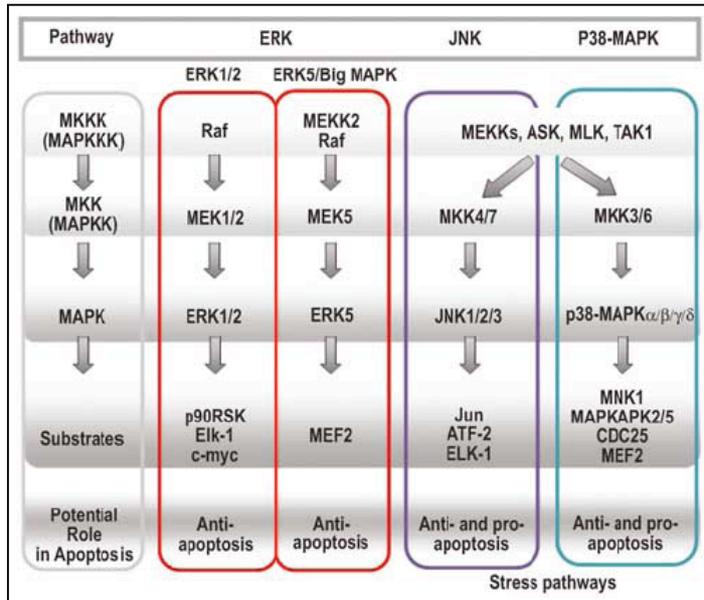


Figure 11: Représentation schématique des différentes cascades conduisant à l'activation des MAPKinases. D'après T. Wada et J.M. Penninger, Oncogene, 2004.

sont possibles comme la signalisation par les récepteurs membranaires via le facteur ASK1³⁴ ou les stress oxydatifs⁸⁶.

A chaque niveau, les kinases sont spécifiques, ce qui permet aux différentes voies d'être activées séparément (Figure 11).

II.8. Le stress oxydatif et l'apoptose

II.8.1. Définition du stress oxydatif

Les espèces activées de l'oxygène qui sont appelées radicaux libres sont des molécules qui contiennent des formes de l'oxygène partiellement réduites comme l'anion superoxyde (O_2^-) et le radical hydroxyl (OH). Les anions superoxydes peuvent en outre réagir avec l'oxyde nitrique pour former des peroxynitrites, de puissants agents oxydants. Les radicaux libres sont produits en condition aérobie et certains jouent un rôle physiologique de messenger. Toutefois, lorsqu'ils sont présents en quantité excessive, ils peuvent être toxiques et provoquer des dégâts au niveau des acides nucléiques, des protéines et des lipides. Dès lors, les cellules sont pourvues de mécanismes de détoxification enzymatique : la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase⁸⁷.

La mitochondrie, et plus précisément la chaîne des phosphorylations oxydatives, constitue le site principal de production des radicaux libres au niveau de la cellule⁸⁸.

On appelle stress oxydatif toute situation qui conduit à un déséquilibre entre production et détoxification des espèces activées de l'oxygène de sorte qu'elles s'accumulent dans la cellule et y provoquent des dégâts.

II.8.2. Le stress oxydatif et l'apoptose

La quantité de radicaux libres augmente au cours de nombreux processus apoptotiques. Toutefois, il est souvent difficile de déterminer si ces espèces réactives de l'oxygène ont un rôle causal dans la mort cellulaire ou si leur production est une conséquence d'altérations, notamment des chaînes respiratoires, consécutives à l'activation d'une cascade apoptotique^{88,89}.

Les mécanismes par lesquels les agents oxydants induisent la mort cellulaire restent imparfaitement compris. Certaines espèces très instables, comme le radical hydroxyl, peuvent provoquer des altérations diffuses et aspécifiques des constituants cellulaires et induire la mort par apoptose ou par nécrose, selon l'importance de l'exposition. Toutefois, les radicaux libres peuvent également activer de multiples cascades d'évènements biochimiques intracellulaires, dont certaines jouent un rôle essentiel dans la mort cellulaire. La voie p38-JNK est l'une des principales d'entre elles. En effet, en condition basale, la thiorédoxine, une protéine sensible aux radicaux libres, inhibe ASK1. L'oxydation provoque la dissociation ASK1-thiorédoxine et permet à ASK1 d'activer les cascades JNK et p38⁹⁰. La mitochondrie est également une cible privilégiée des radicaux libres. En effet, le stress oxydatif est l'un des principaux agents inducteurs de l'ouverture du mPTP⁸⁸. Les radicaux libres sont, en outre, capables de provoquer une élévation du calcium intracellulaire en induisant sa libération à partir des sites de stockage intracellulaire et en augmentant sa captation à partir du milieu. A côté de l'activation de protéines kinases et phosphatases calcium-dépendantes impliquées dans la mort cellulaire, cette élévation du calcium intracellulaire peut faciliter l'ouverture du mPTP⁹¹.

III. La mort cellulaire par nécrose

III.1. Principes de la mort nécrotique

Les cascades biochimiques décrites ci-avant conduisent à la mort cellulaire par le biais de mécanismes finement régulés qui sont consommateurs d'énergie. La mort nécrotique procède de façon radicalement différente puisque la cellule qui la subit est caractérisée par un collapsus énergétique et par l'activation non spécifique d'enzymes qui dégradent les constituants cellulaires.

III.2. Le rôle de la mitochondrie dans la nécrose

Nous avons mentionné précédemment le rôle fondamental de la mitochondrie dans la régulation des processus apoptotiques. Elle occupe aussi une place importante dans la

nécrose, de part sa fonction de production de l'ATP mais aussi parce qu'elle est le siège du mPTP et la principale source d'espèces activées de l'oxygène.

La mort nécrotique est donc caractérisée par un collapsus énergétique précoce, une ouverture massive du mPTP et une production excessive de radicaux libres. La séquence selon laquelle ces événements s'enchaînent au niveau mitochondrial dépend du modèle considéré. Elle a été abondamment étudiée dans l'ischémie/reperfusion⁹². Dans un tissu vivant, l'occlusion vasculaire provoque une interruption de l'apport en oxygène et en glucose. Cette interruption entraîne une chute brutale de la production d'ATP, une diminution transitoire du rapport ATP/ADP, puis une réduction globale du taux de nucléosides par dégradation enzymatique et une élévation de la quantité de phosphates inorganiques. La réduction de la concentration en ATP a deux conséquences directes. Premièrement, l'ATP jouant un rôle inhibiteur dans l'ouverture du mPTP, cette dernière est donc rendue plus aisée. Deuxièmement, le fonctionnement des pompes ioniques qui dépendent de l'ATP est interrompu. Parmi celles-ci, on trouve des pompes calciques de la membrane plasmique et de la membrane mitochondriale. Dès lors, l'occlusion vasculaire, par le biais d'une réduction de la production d'ATP, entraîne une élévation de la concentration en calcium dans le cytosol et la mitochondrie. Or, le calcium mitochondrial, s'il atteint une concentration suffisante (~10 µM) et qu'il existe simultanément une réduction de la quantité d'ATP, peut déclencher l'ouverture du mPTP. Cette ouverture est d'autant plus probable qu'en cas de reperfusion, la réoxygénation du tissu lésé entraîne une production importante de radicaux libres. Cette production est due à l'effet d'enzymes comme la xanthine oxydase qui, partiellement dégradées par des protéases activées par le calcium, acquièrent une activité oxydase non spécifique. En effet, outre l'augmentation de la concentration en calcium mitochondrial, un afflux de calcium dans le cytosol active de nombreuses enzymes de type protéases, nucléases et phospholipases... qui vont contribuer à la dégradation des constituants cellulaires⁹³. Le fonctionnement de la Na⁺,K⁺-ATPase est également compromis par le déficit en ATP. Or, cette pompe intervient notamment dans le maintien de l'équilibre osmotique entre le milieu intra- et extracellulaire. Dès lors, la nécrose s'accompagne d'une augmentation de volume du cytosol qui peut conduire à la rupture de la membrane plasmique.

III.3. Cas particulier du système nerveux : l'excitotoxicité

La situation du système nerveux est particulière. En effet, dans diverses situations pathologiques comme l'ischémie ou encore certaines affections neurodégénératives, une accumulation extracellulaire de glutamate participe aux lésions neuronales. Ce phénomène porte le nom d'excitotoxicité. Le terme d'excitotoxicité a été proposé par Olney dans les années 70 parce qu'il pensait que la mort neuronale pouvait être la conséquence d'un excès d'activité obtenu suite à une surexcitation.

Les mécanismes qui conduisent à l'accumulation extracellulaire de glutamate diffèrent en fonction de la situation pathologique considérée. Lors de l'ischémie cérébrale, l'interruption du fonctionnement des pompes dépendantes de l'ATP, l'excès de radicaux libres et l'acidification du milieu provoque une dépolarisation de la membrane plasmique des neurones

ischémiés, une inversion des systèmes de transport et de recapture du glutamate ainsi que des lésions physiques de la membrane plasmique qui permettent une libération importante de ce neurotransmetteur⁹⁴.

Dans la plupart des cas, la toxicité du glutamate semble associée de façon prépondérante à l'activation du récepteur de type NMDA (N-méthyl-D-Aspartate), ce qui induit une augmentation du calcium intracellulaire et, par voie de conséquence, une activation d'enzymes dépendantes du calcium ainsi qu'une production accrue de radicaux libres et de NO⁹⁵. Lorsque ces événements sont associés à une réduction de la production d'ATP, la mort qu'ils provoquent est nécrotique⁹⁶. Par contre, lorsque la stimulation glutamatergique est moins importante et que la production d'ATP est préservée, la mort excitotoxique peut être de nature apoptotique⁹⁷.

III.4. Les caspases dans la nécrose

Les caspases, dont nous avons dit qu'elles étaient des acteurs cardinaux de l'apoptose, semblent également capables d'influencer la nature de la mort cellulaire subie par une cellule après l'exposition à un agent donné. Par exemple, les cellules L929 (fibrosarcome) subissent une mort typiquement apoptotique lorsqu'elles sont traitées par du TNF_α. Par contre, quand ces mêmes cellules sont traitées par du TNF_α en présence d'un inhibiteur de caspases, elles subissent une mort nécrotique⁹⁸. Le même phénomène a été observé avec les cellules Jurkat (lignée de cellule lymphomateuse). Lorsque les cellules de la lignée sauvage sont exposées au ligand du récepteur Fas, elles subissent une mort apoptotique. Par contre, les cellules de la lignée Jurkat JB-6, caractérisées par une déficience en caspase-8, présentent une mort nécrotique en présence de ce même ligand⁹⁹. Le mécanisme par lequel la présence de caspases actives influence la nature de la mort cellulaire reste à l'heure actuelle hypothétique. L'explication avancée est que certaines caspases dont la caspase-8 auraient un rôle protecteur contre une production excessive de radicaux libres et empêcheraient ainsi le découplage des phosphorylations oxydatives qui peut survenir après une agression, et qui est susceptible de précipiter la cellule vers la nécrose¹⁰⁰.

IV. Buts du travail

La mort cellulaire est donc un phénomène extrêmement complexe. L'apoptose et la nécrose, initialement décrites sur bases d'observations morphologiques, sont les deux extrémités d'un continuum comprenant un nombre presque infini de cascades d'événements intracellulaires susceptibles d'aboutir à la mort. Disséquer ces cascades est indispensable afin de pouvoir un jour les induire, les inhiber ou les moduler. Endiguer les pertes cellulaires au niveau du système nerveux central est en effet un déficit majeur pour la prise en charge des affections neurodégénératives. A l'inverse, induire sélectivement la mort des cellules tumorales dans un organisme constitué par ailleurs de milliard de cellules indispensables à sa survie est l'un des principaux axes de recherche en oncologie médicale.

Nous avons consacré la première partie de notre travail à l'étude de deux neurotoxines endogènes, le facteur neurotoxique d'origine astrocytaire et la n-butyl-beta-carboline-3-carboxylate (β CCB). Les résultats que nous avons obtenus nous ont amené à émettre l'hypothèse d'un rôle du récepteur mitochondrial des benzodiazépines dans la toxicité de la β CCB.

Dans la deuxième partie de ce mémoire, nous avons tenté de mieux préciser le rôle de ce récepteur dans la régulation de la survie et de la mort cellulaire en étudiant le mécanisme moléculaire de la toxicité de l'un de ses principaux ligands pharmacologiques, le 4'-chlorodiazépan.

Publication I : Molecular Pathways involved in apoptotic cell death in the injured cochlea: Cues to novel therapeutic strategies

**Chapitre II : Contribution à l'étude du mécanisme d'action
de deux neurotoxines endogènes : la n-butyl-beta-
carboline-3-carboxylate et le facteur neurotoxique d'origine
astrocytaire**

I. Introduction

La neurotoxicité peut être définie comme la capacité d'un agent chimique, biologique ou physique d'altérer le fonctionnement ou la structure du système nerveux¹⁰¹. Certains auteurs estiment que jusqu'à 25 % des substances chimiques disponibles dans le commerce ont des effets neurotoxiques. L'exposition du système nerveux à ces toxiques peut, entre autres, avoir des conséquences délétères sur la motricité, la perception sensitive, le comportement et la cognition des individus.

Certains agents neurotoxiques, comme la rotenone, peuvent être présents dans l'environnement, absorbés par l'alimentation et exercer leur effet au niveau du système nerveux sans modification préalable. D'autres doivent être métabolisés après leur absorption avant d'exercer leur action neurotoxique¹⁰². C'est le cas du MPTP (1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) qui est oxydé en MPP⁺ (1-méthyl-4-phenyl-1-pyridinium) par les cellules gliales¹⁰³. Enfin, certaines molécules endogènes présentent des propriétés neurotoxiques. C'est notamment le cas de produits du métabolisme naturel des cellules gliales, comme le NO¹⁰⁴, de certains neurotransmetteurs comme le glutamate¹⁰⁵ ou la dopamine¹⁰⁶, et de petites molécules non peptidiques comme les β -carbolines ou les tétraisoquinolines¹⁰⁶.

A côté de l'identification des neurotoxines et de l'étude de leur métabolisme, la recherche des mécanismes moléculaires par lesquels ces substances provoquent des lésions du système nerveux est un des principaux défis de la neurotoxicologie. Elle devrait en effet permettre de mieux prévenir et traiter les conséquences de l'exposition aux neurotoxiques.

Nous avons consacré cette partie de notre travail à caractériser deux agents neurotoxiques endogènes, la n-butyl-beta-carboline-3-carboxylate et le facteur neurotoxique d'origine astrocytaire.

II. Les β -carbolines et la neurotoxicité de la β -CCB

Les beta-carbolines (β Cs) et les tetrahydro-beta-carbolines (TH β Cs) sont un groupe de substances naturelles présentes dans les plantes, certains aliments grillés et certains tissus animaux. Elles se caractérisent par une structure tricyclique pyrido[3,4-b]indole^{107;108}.

II.1. Les composés harmane et norharmane

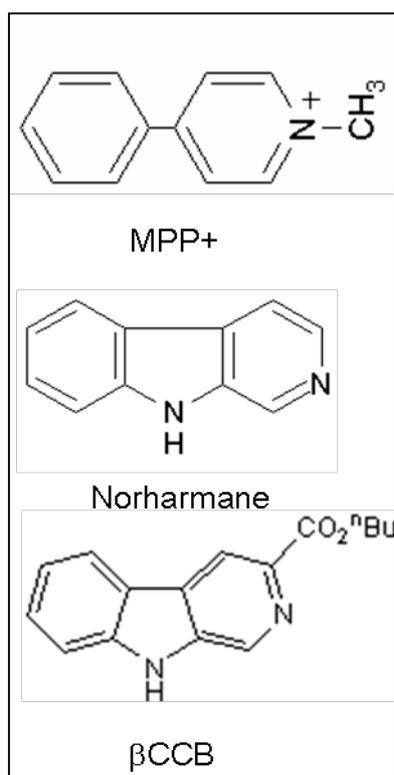


Figure 12: Structures moléculaires du MPP+, de la norharmane et de la β CCB.

La structure moléculaire des β Cs est proche de celle du MPTP, une molécule neurotoxique qui provoque l'apparition d'un syndrome extrapyramidal lorsqu'elle est administrée aux mammifères (Fig. 12). Les β Cs qui ont été le plus fréquemment isolées à partir de tissus humains et animaux sont les composés harmane et norharmane¹⁰⁹ ainsi que la n-butyl-beta-carboline-3-carboxylate (β CCB)¹¹⁰⁻¹¹².

L'éventuelle implication des β Cs harmane et norharmane dans la pathogénie de la maladie de Parkinson a fait l'objet de plusieurs études. Dans le cerveau, ces molécules peuvent être oxydées par la monoamine oxydase B et méthylées par la phenylethanolamine N-méthyltransférase¹¹³. Ces réactions conduisent à la formation des ions 2-N-méthyl-Norharmanium et 2,9-N-diméthyl-norharmanium. Lorsque ces ions sont injectés chez l'animal, ils donnent lieu à l'apparition d'un syndrome parkinsonien¹¹⁴. En outre, à faible concentration, ces ions induisent sélectivement la mort des neurones dopaminergiques en culture¹¹⁴. Par contre, à plus haute concentration, leur toxicité s'étend à de nombreux types de neurones¹⁰⁸. L'importance potentielle de ces β Cs dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson a été renforcée par la découverte de 2,9-diméthyl-norharmanium en quantité

accrue dans le liquide céphalorachidien des patients parkinsoniens par rapport aux sujets contrôles¹¹⁵.

Le mécanisme moléculaire par lequel les β Cs harmane et norharmane induisent la mort cellulaire est peu connu. Des expériences pratiquées sur des lignées de neuroblastomes ont montré que les cellules exposées à ces agents présentaient les stigmates d'une fragmentation apoptotique de l'ADN ainsi qu'une réduction du niveau d'ATP intracellulaire de l'ordre de 70 %¹⁰⁸. Un site de liaison pour ces molécules a été identifié au niveau des membranes mitochondriales¹¹⁶.

II.2. La β CCB

II.2.1. Introduction

La β CCB est une autre beta-carboline dont la structure est proche des composés harmane et norharmane (Fig. 12). Elle est surtout connue en tant qu'agoniste inverse du site de liaison des

benzodiazépines sur le récepteur au GABA de type A¹¹¹. Sa présence a été décelée dans l'urine humaine¹¹⁰ et dans le cerveau de bovin^{111;112}. A l'heure actuelle, il n'existe aucune donnée quant à son métabolisme et sa distribution dans l'organisme humain. Nous avons découvert que cette β -carboline est capable d'induire, en culture, l'apoptose des neurones granulaires du cervelet de rat¹¹⁷.

Le mécanisme de la neurotoxicité de la β CCB nous a paru intéressant à étudier. En effet, cette molécule a été identifiée à plusieurs reprises dans le cerveau des mammifères. Comme les autres composés de la famille des β Cs, elle est probablement présente en quantité abondante dans l'environnement et est susceptible de se retrouver dans l'alimentation. Sa structure est proche de celle d'autres β Cs ainsi que du MPTP dont l'importance n'est plus à démontrer dans l'étude des facteurs environnementaux impliqués dans la pathogénie de la maladie de Parkinson. Il n'est dès lors pas exclu que toutes ces molécules induisent la mort neuronale en activant des cascades apoptotiques semblables et dont l'étude contribuera à une meilleure compréhension des phénomènes biochimiques responsables de cette affection.

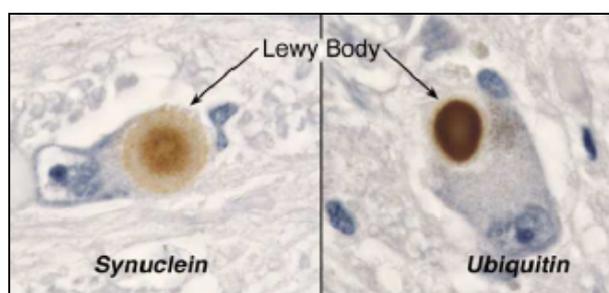


Figure 13: Illustration d'un corps de Lewy marqué immunologiquement pour l'alpha-synucléine et l'ubiquitine. D'après Dauer, Neuron, 2003.

La forme idiopathique de la maladie de Parkinson est, en effet, parmi les maladies neurodégénératives, celle pour laquelle l'hypothèse neurotoxique est la mieux étayée. On pense que l'exposition prolongée à des agents neurotoxiques provoque, préférentiellement au niveau des neurones dopaminergiques du striatum, la survenue d'un stress oxydatif. Ce stress oxydatif induit des modifications post-traductionnelles au niveau de certaines protéines, dont l' α -synucléine et l'ubiquitine, qui s'accumulent

alors sous la forme d'agrégats résistants à la protéolyse. Ces agrégats sont visibles sous forme d'inclusions éosinophiles dans les neurones dopaminergiques survivants et portent le nom de corps de Lewy¹⁰³.

Nous avons choisi d'utiliser le modèle des grains cérébelleux en culture pour réaliser cette étude. La neurotoxicité de la β CCB a en effet initialement été caractérisée dans ce type cellulaire¹¹⁷. En outre, ces cultures présentent plusieurs avantages : i) la population neuronale est très homogène, ii) la contamination par des cellules gliales est faible, inférieure à 5 %¹¹⁸ et iii) elles permettent une étude aisée des cascades apoptotiques et en particulier, des événements mitochondriaux qui peuvent intervenir dans le déclenchement de l'apoptose. Elles ont donc abondamment été utilisées pour étudier les mécanismes d'action de nombreuses substances neurotoxiques, y compris certaines potentiellement impliquées dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson^{119;120}.

II.2.2. Contribution Personnelle : étude du mécanisme de la toxicité de la β CCB dans les neurones granulaires du cervelet en culture (Publication 2)

1. La β CCB induit la mort des neurones granulaires du cervelet (NGC) de façon dose-dépendante, mais pas celle des astrocytes

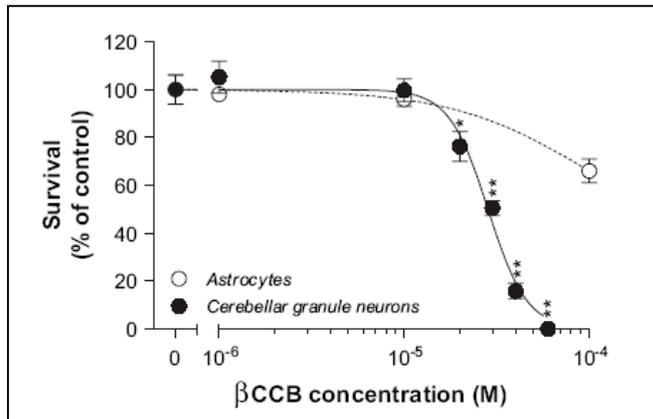


Figure 14: Effet de la β CCB sur la survie des astrocytes et des neurones granulaires du cervelet.

Nous avons d'abord observé que, dans les cultures de neurones granulaires du cervelet (NGC), la β CCB induit de façon dose-dépendante une mort cellulaire. Après traitement par la β CCB et incubation avec du MTT, nous avons ensuite constaté que cette mort concerne principalement les neurones et que la survie des quelques cellules gliales qui contaminent la culture n'est pas affectée (Fig. 14). Nous avons alors étudié l'effet

de la β CCB sur la survie des astrocytes en culture et observé qu'ils sont résistants à la toxicité de cette molécule.

2. Il existe une liaison spécifique de la β CCB aux NGCs en culture. En outre, la β CCB semble s'accumuler dans le compartiment intracellulaire des neurones, mais pas des astrocytes.

Le seul récepteur connu de la β CCB est le site de liaison des benzodiazépines du récepteur GABA de type A. En recherchant un autre site de liaison en relation avec sa neurotoxicité, nous avons observé une accumulation neuronale de la β CCB dans un compartiment à échange lent, probablement intracellulaire. Les astrocytes et les fibroblastes en culture sont par contre incapables d'accumuler la β CCB (Fig. 15C). Nous avons dès lors émis l'hypothèse que le récepteur responsable de la toxicité de la β CCB pourrait être intracellulaire. L'absence d'accumulation intracellulaire de cette molécule dans les astrocytes expliquerait leur résistance à sa toxicité. Une autre explication possible à l'absence de toxicité de la β CCB sur les cultures d'astrocytes réside dans les différences métaboliques qui existent entre ces deux types cellulaires. Les astrocytes ont en effet une résistance métabolique supérieure à celle des neurones. Ainsi, le NO induit une mort rapide des neurones corticaux de souris en inhibant le fonctionnement des chaînes respiratoires alors que les astrocytes compensent un même degré d'inhibition de la respiration par une augmentation de l'activité glycolytique¹⁰⁴.

En ce qui concerne le mécanisme de transport responsable de l'accumulation intracellulaire de la β CCB, les données expérimentales dont nous disposons permettent d'exclure un phénomène de transport actif (indépendance vis-à-vis de la température) et suggèrent l'intervention d'un transporteur (dépendance vis-à-vis du potentiel de membrane) (Fig. 15.D). Sa nature nous restant inconnue, nous ne pouvons à ce stade qu'émettre des hypothèses. La β CCB est une molécule faiblement chargée. On sait que le MPP⁺ s'accumule dans les neurones dopaminergiques via le transporteur de la dopamine¹²¹, mais ce n'est probablement pas le cas de la β CCB car les NGC en culture n'expriment pas ce transporteur¹²⁰. On peut également écarter les transporteurs du glutamate et probablement les transporteurs des acides aminés cationiques (CAT) parce qu'ils sont également exprimés par les astrocytes en culture¹²². Par contre, le transporteur polyspécifique des cations organique de type 3 (OCT3), qui permet l'accumulation du MPP⁺ dans les NGC, et n'est pas exprimé par les astrocytes, est un candidat potentiel¹²⁰.

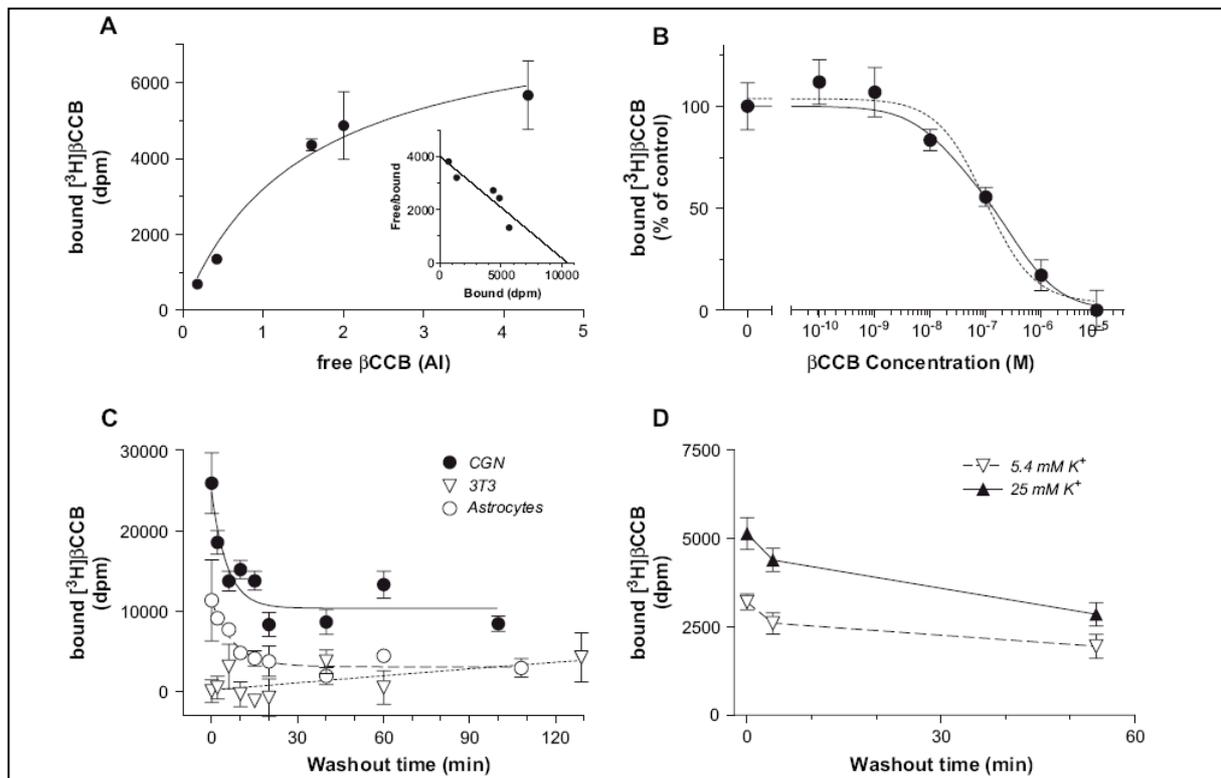


Figure 15: Caractéristiques de liaison et d'accumulation intracellulaire de la β CCB dans différents types cellulaires (détails dans la publication 2). A. Etude de la liaison spécifique d'une solution de $[^3H]\beta$ CCB dans une culture de NGC. B. Déplacement de la liaison de $[^3H]\beta$ CCB dans une culture de NGC par des concentrations croissantes de β CCB froide. C. Illustration de l'accumulation intracellulaire de β CCB dans les neurones mais pas dans les astrocytes ni les fibroblastes. D. Influence du potentiel de membrane sur l'accumulation intracellulaire de la β CCB.

3. Dans les NGC, la β CCB active successivement les caspases 9, 3 et 8 mais seuls les inhibiteurs sélectifs des caspases 3 et 9 protègent les neurones contre sa toxicité.

Dans les NGC traités par de la β CCB, nous avons observé une activation successive des caspases 9, 3 et 8 (Fig. 16). Cette séquence d'activation des caspases suggère que le déclenchement de l'apoptose dans ce modèle a une origine mitochondriale⁵⁰. Les expériences de protection réalisées avec les inhibiteurs spécifiques des différentes caspases nous ont permis de confirmer que les caspases 9 et 3 ont un rôle clé dans la mort neuronale induite par la β CCB. En ce qui concerne la caspase 8, nous pensons que son rôle est accessoire parce que, d'une part, son activation est tardive et que, d'autre part, son inhibiteur spécifique ne protège pas contre la toxicité de la β CCB (Fig. 17).

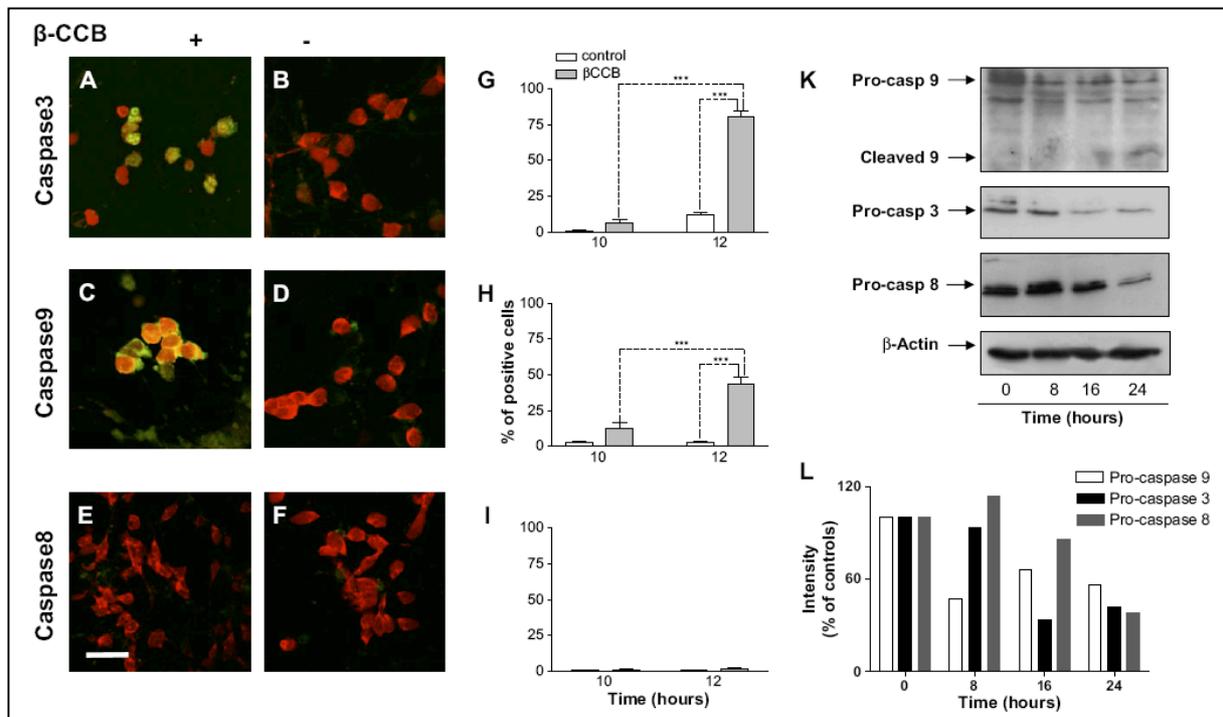


Figure 16: Illustration de l'activation des caspases induite par la β CCB dans les NGC. A-F : Marquage fluorescent des caspases activées après 12 heures d'exposition à la β CCB. Le rouge correspond au marquage nucléaire et le vert à la caspase activée. G-I : Quantification du nombre de cellules marquées pour les différentes caspases après 10 et 12 heures d'exposition à la β CCB. K : Etude de l'activation des caspases par western blot au cours d'un traitement de 24 heures par la β CCB d'une culture de NGC. L : Quantification densitométrique du western blot.

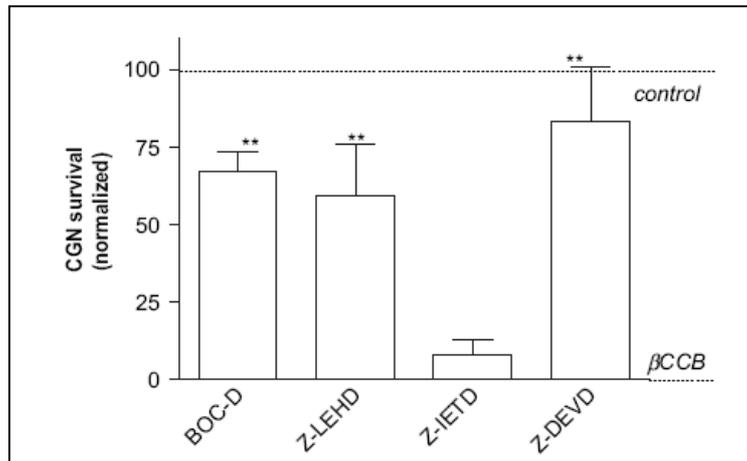


Figure 17: Effet de différents inhibiteurs de caspases sur la toxicité de la β CCB dans les cultures de NGC. Les données sont normalisées de telle sorte que 100 % corresponde à la survie dans les contrôles et 0% à celle dans une culture traitée par la β CCB à une concentration de 30 μ M. Les inhibiteurs des caspase-3, -9 et l'inhibiteur pancaspase respectivement désignés Boc-D, Z-LEHD et Z-DEVD protègent contre la toxicité de la β CCB. L'inhibiteur de caspase 8 (Z-IETD) est inactif.

4. Dans les NGC traités par la β CCB, le cytochrome c et l'AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) sont libérés par la mitochondrie au moment de l'activation des caspases.

Après avoir observé que l'activation de la caspase 9 survient précocement lors du traitement par la β CCB, nous avons orienté nos recherches vers la mitochondrie. Nos résultats montrent que, dans les NGC traités par cette molécule, l'activation des caspases est précédée par la libération, dans le cytosol, de deux facteurs pro-apoptotiques d'origine mitochondriale : le cytochrome c et l'AIF (Fig. 18 et 19).

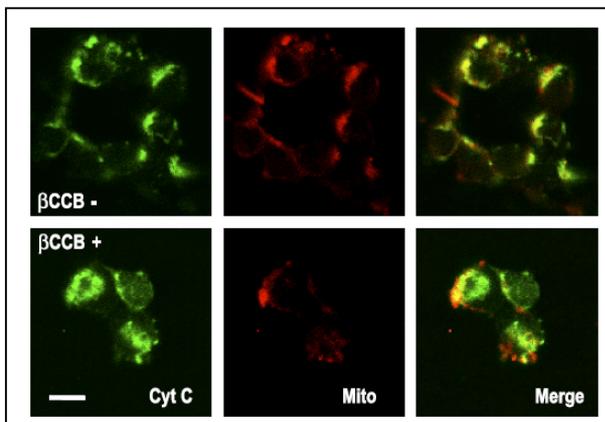


Figure 18: Démonstration de la libération cytosolique du cytochrome c induite par la β CCB dans une culture de NGC par la mise en évidence d'une délocalisation entre un marquage mitochondrial (rouge) et le cytochrome c (vert).

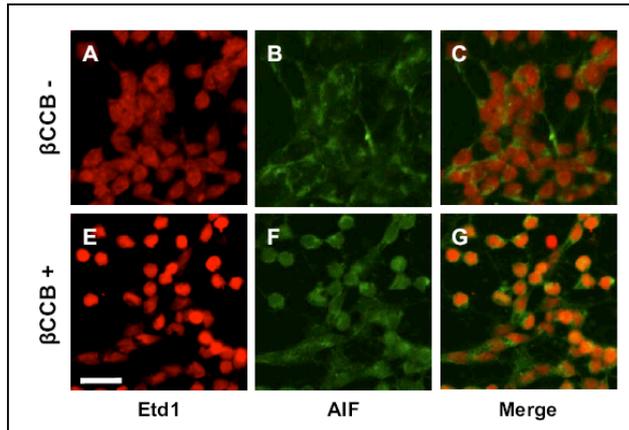


Figure 19: Illustration de la translocation nucléaire de l'AIF induite par la β CCB dans les NGC en culture par l'apparition d'une co-localisation entre le marquage nucléaire (rouge) et l'AIF (vert).

5. Le traitement des NGC par la β CCB n'induit pas de modification du potentiel de membrane mitochondrial.

Nous nous sommes ensuite intéressés au mécanisme moléculaire responsable de cette libération en étudiant le potentiel de membrane mitochondrial des NGC traités par β CCB. Au cours du traitement, nous n'avons pas observé de modifications du $\Delta\psi_m$ durant la période qui précède la libération cytosolique des facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux (Fig 20, partie gauche). Cette absence de modification du potentiel de membrane mitochondriale indique donc que la membrane mitochondriale interne reste intacte et que la libération du cytochrome c et de l'AIF est consécutive à une perméabilisation sélective de la membrane mitochondriale externe¹²³. Nous avons confirmé cette hypothèse en montrant que deux inhibiteurs du mPTP (*Mitochondrial Permeability Transition Pore*), l'acide bongkrelique et la cyclosporine A, ne protègent pas les NGC contre la toxicité de la β CCB lorsqu'ils sont utilisés aux concentrations où ils sont efficaces vis-à-vis de celle de l' H_2O_2 (Fig. 20, partie droite).

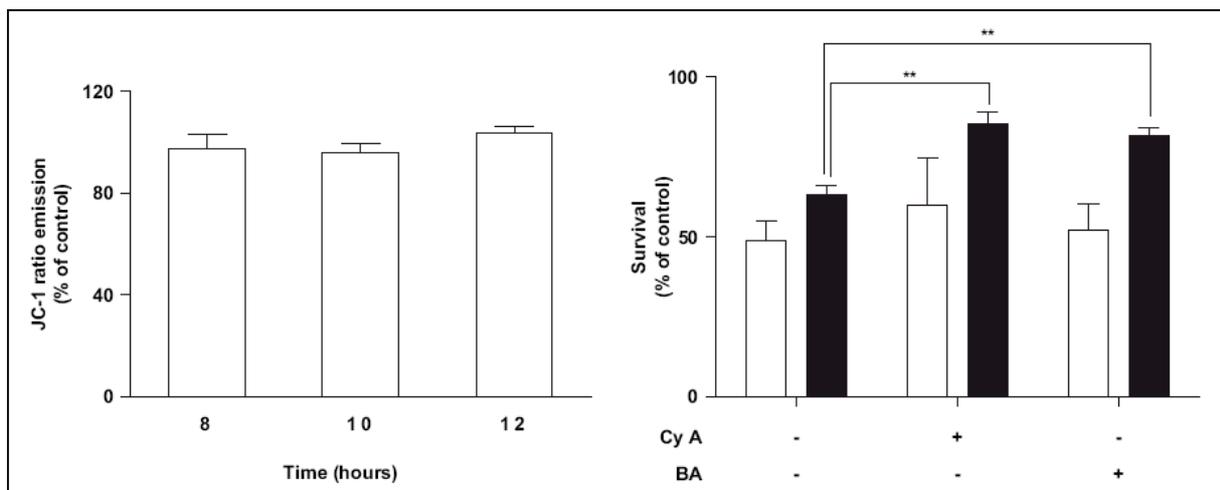


Figure 20: Gauche. La β CCB n'influence pas le potentiel de membrane mitochondrial comme le montre l'absence de variation du ratio d'émission du fluorochrome JC-1. Droite: Deux inhibiteurs du mPTP, la cyclosporine A et l'acide Bongkrékique, ne protègent pas les NGC contre la toxicité de la β CCB (barres blanches) alors que ils protègent contre la toxicité de l' H_2O_2 (barres noires).

II.2.3. Mécanisme d'action de la β CCB : conclusions

En conclusion, les données que nous avons recueillies permettent d'affirmer que, dans des cultures de neurones granulaires de cervelet de rat, la β CCB induit sélectivement la mort des neurones. Les cellules gliales contaminant la culture sont épargnées et la β CCB n'est pas toxique pour les astrocytes en culture primaire. Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent cette mort sont ceux de la voie intrinsèque, c'est-à-dire mitochondriale, de l'apoptose. Ils semblent initiés par une perméabilisation sélective de la membrane mitochondriale externe. La cible moléculaire primaire de la β CCB à l'origine de cette cascade doit encore être identifiée.

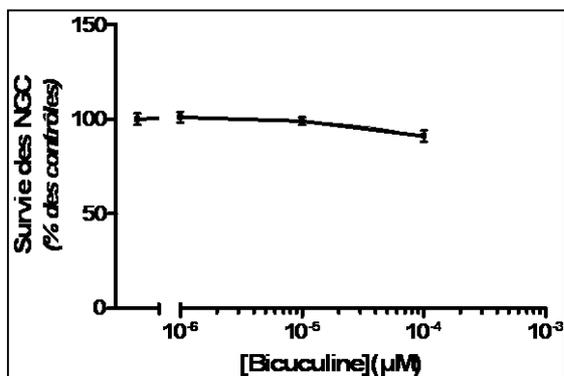


Figure 21: Effet de la bicuculine sur la survie des NGC en culture évalué par le test MTT après 24 heures.

trophique¹²⁴. Nous aurions dès lors tendance à privilégier l'hypothèse d'une cible intracellulaire.

Nous savons que la β CCB inhibe les courants induits par le GABA en se fixant au site de liaison pour les benzodiazépines situés sur ce récepteur. Bien que le GABA et le diazepam protègent les NGC vis-à-vis de la toxicité de la β CCB, l'inhibition des courants GABA ne nous paraît pas un mécanisme d'action vraisemblable. En effet, la bicuculine, un antagoniste compétitif du GABA, à une concentration de 10 μ M où elle inhibe complètement les courants induits par le GABA, n'affecte en rien la survie des NGC (Fig. 21.). Il est donc plus probable que l'effet protecteur du GABA soit lié à son action dépolarisante, et, par voie de conséquence,

III. Le facteur neurotoxique d'origine astrocytaire (NAF)

III.1. Introduction : la fonction astrocytaire

Les astrocytes sont les cellules gliales les plus nombreuses dans le cerveau. Bien qu'ils aient fait l'objet d'intenses recherches, toutes leurs fonctions sont encore loin d'être connues. On pensait initialement que leur rôle était essentiellement mécanique, assurant la cohésion entre neurones, vaisseaux sanguins et autres cellules gliales¹²⁵. A côté de ce rôle de charpente, de nombreuses autres fonctions astrocytaires ont progressivement été découvertes. Nous nous limiterons ici à décrire brièvement l'influence que peuvent avoir les astrocytes sur la survie des neurones.

III.1.1. Les astrocytes peuvent protéger les neurones

Il existe de nombreuses données expérimentales en faveur d'un rôle trophique et protecteur des astrocytes vis-à-vis des cellules neuronales. Nous avons déjà mentionné précédemment que le stress oxydatif joue un rôle important dans de nombreuses situations conduisant à la mort neuronale, comme l'ischémie cérébrale¹²⁶ ou certaines affections neurodégénératives¹⁰³ dont la maladie de Parkinson. Les astrocytes protègent les neurones contre ce stress oxydatif, notamment en leur fournissant des agents anti-oxydants comme le glutathion et ses précurseurs¹²⁷. De façon plus générale, ils augmentent aussi la résistance des neurones aux agressions en produisant de nombreux facteurs de croissance et des cytokines qu'ils libèrent dans le milieu grâce à l'activité de transporteurs spécifiques¹²⁸. Enfin, en recyclant le glutamate en glutamine, les astrocytes protègent les neurones contre une exposition prolongée et toxique à ce neurotransmetteur qui peut induire leur mort excitotoxique (cf. introduction générale)¹²⁹.

III.1.2. Les astrocytes peuvent aussi participer à la mort neuronale

Dans d'autres circonstances, et en particulier dans certaines situations pathologiques, les astrocytes semblent favoriser la mort des neurones qui les entourent. Un des mécanismes de cette toxicité est la libération de NO par les cellules astrocytaires, qui survient suite à l'induction par des cytokines ou par le calcium d'une activité NO-synthase¹³⁰. Alors que les astrocytes sont résistants au NO, cette molécule induit généralement la mort des neurones en inhibant le fonctionnement des chaînes respiratoires et en donnant lieu à la formation de radicaux peroxy-nitrites¹⁰⁴. La libération massive de glutamate que provoque l'inversion des transporteurs astrocytaires du glutamate observée dans certaines situations pathologiques est un autre mécanisme de la toxicité astrocytaire^{94;131}. Dans cette partie de notre travail, nous synthétiserons les données relatives à un autre facteur neurotoxique, produit par les astrocytes, et dont l'identification moléculaire n'a pas encore pu être faite à ce jour.

III.2. Le facteur neurotoxique d'origine astrocytaire : propriétés et éléments d'identification (Publication 3)

1. Les microexplants de cervelets, les cellules cérébelleuses en culture dissociée, et les astrocytes en culture dissociée libèrent dans le milieu un facteur neurotoxique (NAF, Neurotoxic Astrocyte Derived Factor).

De façon fortuite, nous avons observé que les milieux conditionnés par des cultures de cervelets en explants, par des cultures dissociées de cervelet ou par des cultures d'astrocytes contiennent un facteur neurotoxique (NAF) de faible poids moléculaire (< 1000 Da) et résistant aux variations de pH et de température. Ce facteur n'est pas produit par les cellules neuronales ou fibroblastiques, suggérant son origine principalement astrocytaire.

2. La mort neuronale induite par le NAF satisfait aux critères d'une mort apoptotique (Publication 3, Fig. 1).

Nous avons ensuite étudié la neurotoxicité du NAF dans des cultures de neurones granulaires de cervelets de rat (NGC) et observé qu'elle a une cinétique lente. En effet, elle apparaît après 24 à 36 heures. En outre, lors de l'addition d'actinomycine D ou de cycloheximide avec le NAF, deux inhibiteurs respectivement de la synthèse d'ARN et de protéines, nous avons observé un effet protecteur. Cette observation suggère que la mort cellulaire induite par le NAF requiert la synthèse de nouvelles protéines et donc, qu'elle est de nature apoptotique. L'étude de la fragmentation de l'ADN dans les NGC traités par le NAF a confirmé cette hypothèse (Fig. 22).

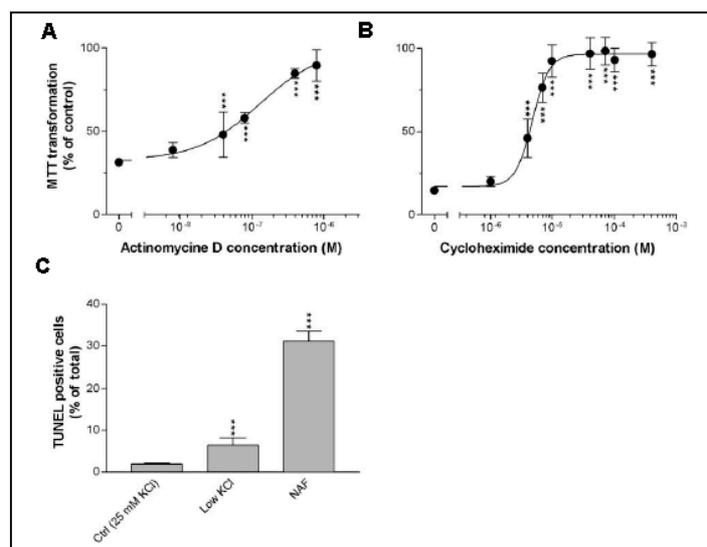


Figure 22: L'effet protecteur de l'actinomycine D (A) et de la cycloheximide (B) sur la toxicité du NAF dans les NGC en culture associé à l'augmentation du nombre de cellules positives pour le marquage TUNEL après exposition au NAF (C) suggère que la mort induite par ce facteur astrocytaire est de nature apoptotique.

3. Le NAF se comporte comme un effecteur allostérique négatif du site de liaison des benzodiazépines associé au récepteur au GABA de type A.

Nous avons observé que le GABA et certaines benzodiazépines protègent les neurones contre la toxicité du NAF (Fig. 21). Ces résultats nous ont incités à étudier les propriétés électrophysiologiques du NAF et à rechercher une interaction avec le récepteur au GABA de type A. Nous avons effectivement démontré que le NAF inhibe les courants induits par le GABA et la glycine. Cet effet inhibiteur est antagonisé par l'application de flumazénil, un antagoniste du site benzodiazépine des récepteurs au GABA de type A. Ces données électrophysiologiques suggèrent donc que le NAF se lie au récepteur des benzodiazépines présent sur le récepteur au GABA_A et s'y comporte comme un agoniste inverse.

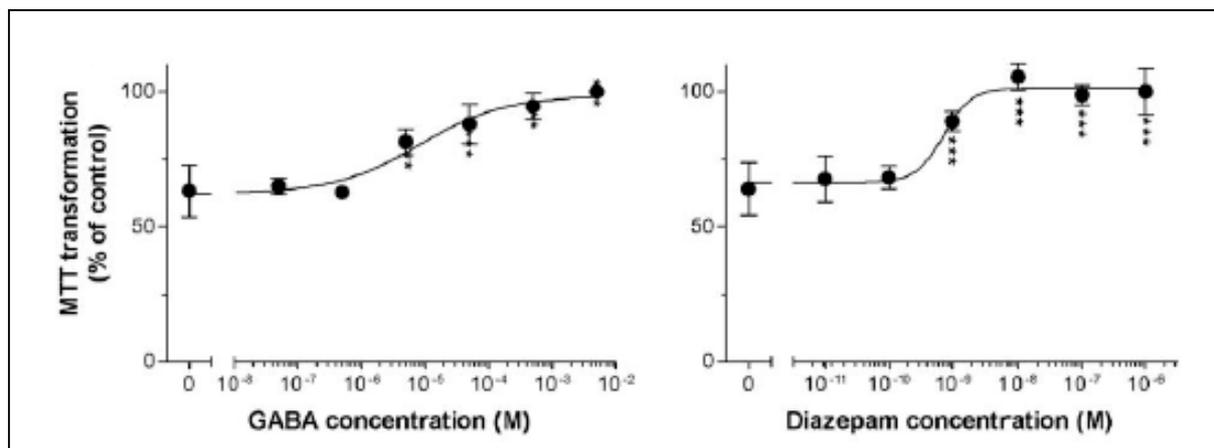


Figure 23: Effet protecteur du GABA (gauche) et du diazepam (droite) sur la toxicité du NAF dans les NGC en culture.

Il présente donc des propriétés électrophysiologiques similaires à certaines β -carboline dont la β CCB qui est également capable d'inhiber les courants induits par la glycine.

4. Malgré la mise en œuvre d'une approche chimique, biologique et physiologique, l'identité moléculaire du NAF n'a pas encore été découverte.

En résumé, nous avons donc mis en évidence l'existence d'un facteur de faible poids moléculaire, produit par les astrocytes en culture et capable : i) d'induire une mort neuronale de type apoptotique. ii) de se comporter comme un agoniste inverse du site benzodiazépine du récepteur au GABA de type A.

Nous avons ensuite émis l'hypothèse qu'un tel facteur, potentiellement endogène et neurotoxique, pourrait jouer un rôle dans certaines affections neurodégénératives. Nous avons entrepris de le purifier en ayant recours à une triple approche.

L'étude de la composition du milieu conditionné par les astrocytes en chromatographie liquide à haute performance s'est malheureusement révélée infructueuse et n'est pas détaillée dans ce travail.

Les expériences de compétition entre le NAF et plusieurs ligands marqués radioactivement nous ont permis de mieux comprendre l'action du NAF, mais ne nous ont pas aidés à l'identifier. En résumé, nous avons observé que le NAF augmente la liaison du TBPS (t-butylbicyclophosphoro[35S]thionate), un ligand du canal chlore dont la liaison est augmentée par les agonistes inverses du site benzodiazépine comme les β -carboline. Par contre, il diminue la liaison du muscimol et n'a pas d'effet sur celle des benzodiazépine au récepteur GABA_A (Fig. 24). Ces données sont donc en apparente opposition avec les résultats électrophysiologiques qui suggèrent que le NAF se comporte comme un agoniste inverse du site de liaison des benzodiazépine sur le récepteur GABA_A. Ceci nous a donc amené à

émettre l'hypothèse que le NAF agit probablement en dehors du site de liaison habituel des benzodiazépines, par exemple au niveau du site de liaison du Ro 5-4864¹³², ou encore au niveau du site de faible affinité des benzodiazépines décrit sur le récepteur GABA_A¹³³. A l'instar de ce que nous avons décrit pour la βCCB, l'inhibition des courants induits par le GABA ne nous paraît pas un mécanisme d'action suffisant pour expliquer la neurotoxicité du NAF. Nous aurions donc également tendance à privilégier l'hypothèse de l'existence d'un récepteur intracellulaire.

Ligand	Preparation	NAF dilution 1 :10 (% change v SD)	P
[³ H]flunitrazepam	Adult cortex	101±2	> 0.05
[³ H]Ro 15-1788	Adult cortex	98±3	> 0.05
	Adult cerebellum	104±2	> 0.05
	Cultured cerebellum	97±1	> 0.05
[³ H]Ro 15-4513	Adult cerebellum	105±4	> 0.05
	Cultured cerebellum	102±8	> 0.05
[³ H]muscimol	Adult cortex	46±3	<0.001
[³⁵ S]TBPS	Adult cortex	120±1	<0.001

Figure 24: Effet du NAF sur la liaison de différents ligands du récepteur au GABA.

Le NAF n'influence pas les liaisons des ligands du site benzodiazépine (Ro 15-1788, Ro 15-4523 et flunitrazepam). Par contre, il augmente la liaison du TBPS et diminue celle du muscimol.

Enfin, nous avons observé que certaines amines et certains inhibiteurs d'enzymes impliqués dans le métabolisme des mono- et des polyamines, lorsqu'ils sont ajoutés au milieu, modulent la production de NAF par les astrocytes. Nous avons alors pensé que le NAF pourrait être une de ces amines. Malheureusement, parmi les composés isolés, aucun à ce jour n'a été capable de reproduire les effets du NAF en induisant à la fois une mort neuronale apoptotique et en inhibant les courants induits par le GABA.

III.2.1. Le NAF : Conclusions

Dans le laboratoire, nous avons donc mis en évidence la production par les astrocytes d'un facteur de faible poids moléculaire à la fois capable d'induire une mort neuronale de type apoptotique et de produire une inhibition des courants induits par le GABA. D'un point de vue « phénotypique », ce NAF partage donc les deux propriétés principales reconnues de certaines beta-carbolines comme la βCCB. Il serait bien sûr tentant de conclure que le NAF est une β-carboline endogène. Seule l'indentification moléculaire du NAF permettra de répondre à cette question.

III.3. Partie II : Perspectives

Cette partie de notre travail a donc été consacrée à la caractérisation de deux neurotoxines endogènes, la βCCB et le facteur neurotoxique d'origine astrocytaire. De nombreuses questions doivent encore être résolues afin de mieux définir le rôle éventuel de ces facteurs neurotoxiques dans la physiopathologie d'affections neurodégénératives ainsi que pour comprendre complètement leur mécanisme d'action.

L'intérêt de l'étude des mécanismes d'action du NAF et de la βCCB serait en effet renforcé par la démonstration de leur présence en quantité accrue dans le système nerveux des patients

atteints de maladies causées par un excès de mort neuronale à l'instar de ce qui a été montré pour d'autres β -carbolines¹¹⁵ et pour certaines tetrahydroisoquinolines (TIQs)¹⁰⁶.

L'étude des réactions biochimiques susceptibles de conduire à la formation de petites molécules neurotoxiques comme la β CCB ou le NAF constitue une autre perspective de ce travail. Pour la β CCB, Braestrup a suggéré que sa formation pourrait résulter de la condensation non enzymatique de tryptophane avec un atome de carbone (réaction de Pictet&Spengler)¹¹⁰. Une réaction analogue pourrait conduire à la synthèse de tetrahydroisoquinolines à partir de la dopamine¹³⁴ bien que pour ces dernières, il semble également exister une voie de synthèse enzymatique dans le système nerveux des mammifères¹³⁴. La toxicité des β Cs et des TIQs est augmentée lorsqu'elles sont méthylées par la N-methyltransférase. L'activité de cette enzyme est plus importante chez les patients parkinsoniens que chez les sujets contrôles¹³⁵. Par contre, aucune donnée n'est disponible quant aux mécanismes de transport, de métabolisation intracellulaire éventuelle et de dégradation de ces toxines. L'étude de leur métabolisme devrait permettre de mieux comprendre leur formation, leur distribution et leur élimination afin d'un jour, pouvoir interférer avec ces phénomènes dans le cadre d'une stratégie de neuroprotection. En ce qui concerne le NAF, aucune hypothèse ne peut être formulée avant l'aboutissement de son identification moléculaire qui est rendue complexe par les nombreux contaminants présents dans le milieu conditionné dont il est issu.

L'identification des cibles intracellulaires responsables de la toxicité de ces molécules est certainement l'une des perspectives les plus intéressantes et les plus prometteuses de ce travail. Elle est en effet susceptible de contribuer au développement de nouveaux outils thérapeutiques capables d'endiguer la neurotoxicité de ces agents, et donc, la progression des affections à la physiopathologie desquelles ils pourraient contribuer. En ce qui concerne la β CCB, nous avons plusieurs raisons de penser que sa cible est intracellulaire. Parmi les molécules candidates, le récepteur mitochondrial des benzodiazépines est l'une des plus intéressantes. En effet, ce récepteur lie les benzodiazépines et est donc susceptible de lier la β CCB. Il est situé au niveau de la membrane mitochondriale externe dont il pourrait contribuer à réguler la perméabilité et, par conséquent, la survie des cellules. C'est à l'étude de ce récepteur que nous avons consacré la seconde partie de notre travail.

Publication II : β -Carbolines induce apoptosis in cultured cerebellar granule neurons via the mitochondrial pathway

**Publication III : Modulation of neuronal survival and
excitability by an astroglia-derived factor**

**Chapitre III : Contribution à l'étude du mécanisme de la
toxicité des ligands du récepteur
périphérique/mitochondrial des benzodiazépines**

I. Introduction

Le récepteur périphérique des benzodiazépines est un site de liaison pour les benzodiazépines différent de celui associé au récepteur au GABA de type A. Il a initialement été découvert en étudiant la liaison des benzodiazépines sur du tissu non nerveux. Il correspond à une protéine de 18 kDa principalement localisée au niveau de la membrane mitochondriale externe. C'est parce qu'il a été, pour la première fois, mis en évidence en dehors du système nerveux central qu'il est appelé récepteur périphérique¹³⁶. Il est toutefois également exprimé par les cellules gliales¹³⁷ ainsi que par les neurones. Dans la mesure où sa localisation cellulaire est principalement mitochondriale, il a aussi été dénommé récepteur mitochondrial des benzodiazépines. Cependant, il s'agit à nouveau d'un abus de langage, sa présence ayant également été décrite au niveau des membranes plasmique, nucléaire et du réticulum endoplasmique¹³⁷. Par souci de clarté et de cohérence avec la littérature anglo-saxonne, nous avons choisi d'utiliser le terme « récepteur périphérique des benzodiazépines » (PBR). Le site de liaison des benzodiazépines associé au récepteur GABA_A sera quant à lui, appelé récepteur central.

I.1. Structure moléculaire et localisation cellulaire du PBR

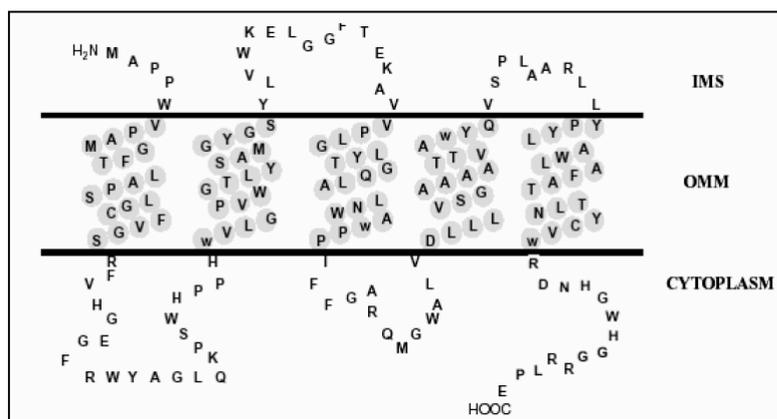


Figure 25: Représentation schématique du PBR. D'après Galiegue et col., Current Med Chem, 2003.

Cette protéine possède cinq domaines transmembranaires organisés en hélices α ^{138;139} (Fig. 25). Elle est principalement localisée au niveau de la membrane mitochondriale externe¹⁴⁰. Le PBR a souvent été co-purifié avec deux autres protéines : l'*Adenine Nucleotide Transporter* (ANT) localisé dans la membrane mitochondriale interne¹⁴¹ et le *Voltage Dependent Anion Channel* (VDAC), présent au niveau de la membrane mitochondriale externe¹⁴². Ceci suggère l'existence d'une interaction moléculaire entre le PBR, VDAC et l'ANT (Introduction, Figure 7). Toutefois, l'association à ces deux autres protéines n'est pas nécessaire pour permettre la liaison du PK 11195^{138;143}.

I.2. Fonctions présumées du PBR

Bien que la fonction du PBR ne soit pas encore connue, de nombreuses données expérimentales suggèrent qu'elle est essentielle. Premièrement, le gène qui code ce récepteur ne contient pas de boîte TATAA, mais bien de multiples boîtes sp1, ce qui est généralement

considéré comme une caractéristique des gènes de structure. Deuxièmement, les animaux mutants, chez qui l'expression de ce gène est abolie, meurent précocement au cours du développement. Enfin, la séquence de ce gène est conservée d'une espèce à l'autre¹⁴⁴.

De très nombreuses hypothèses existent quant au rôle du PBR, mais à jusqu'à présent, aucune fonction ne lui a encore été formellement attribuée. Ceci tient probablement au fait que la plupart des travaux qui l'ont étudié ont utilisé des ligands considérés comme spécifiques du PBR et ont donc davantage étudié l'effet de ces ligands que le rôle du récepteur lui-même.

1.2.1. Régulation de la perméabilité de la membrane mitochondriale et de la mort cellulaire

La localisation du PBR au niveau de la membrane mitochondriale et son interaction avec le VDAC et l'ANT, suggèrent qu'il peut réguler l'ouverture du mPTP et, donc, la perméabilité de la membrane mitochondriale.

De nombreux travaux ont donc étudié l'effet des ligands du PBR sur la survie de différents types cellulaires. Leurs résultats sont contradictoires :

1. Dans certaines lignées cellulaires, le PK 11195, le RO 5-4864 et le FGIN 1-27 provoquent une mort apoptotique¹⁴⁵⁻¹⁴⁹.
2. A l'inverse, d'autres études ont attribué un rôle plutôt cytoprotecteur à ces mêmes agents^{150;151}.

La différence principale entre les études qui rapportent des effets pro-apoptotiques et celles qui démontrent des effets protecteurs se trouve au niveau des concentrations utilisées. En effet, les effets protecteurs sont décrits pour des concentrations de l'ordre du nanomolaire, qui correspondent bien à l'affinité de ces molécules pour le PBR, alors que les effets toxiques n'apparaissent généralement qu'à des concentrations de l'ordre du micromolaire, soit mille fois supérieures. Il est dès lors possible que ces effets pro-apoptotiques soient non spécifiques, indépendants de l'interaction avec le PBR. Quoiqu'il en soit, ces études ne permettent en aucun cas d'attribuer au PBR un rôle clair dans la régulation de la perméabilité de la membrane mitochondriale.

Plusieurs travaux ont montré que l'apoptose induite par les ligands du PBR s'accompagne d'une activation des caspases 3^{145;147;148;152;153} et 9¹⁴⁸, d'une libération cytosolique du cytochrome c^{148;152}, d'une production accrue d'espèces activées de l'oxygène¹⁵⁴, et finalement d'une ouverture du mPTP^{145;148;153-155}. Parmi ces événements, l'activation de la caspase 9, la production de radicaux libres et l'ouverture du mPTP sont des événements mitochondriaux, ce qui a été considéré par les auteurs qui les ont rapportés comme un argument reliant le PBR à l'apoptose induite par ces ligands.

Le rôle du PBR dans la survie et la mort cellulaire ainsi que dans la régulation de l'ouverture du mPTP reste donc très débattu. A notre connaissance, une seule étude a abordé la question sous un angle non pharmacologique. La survie après une exposition aux radiations ultraviolettes des cellules lymphoïdes Jurkat sauvages, qui n'expriment pas le PBR, a été comparée avec celle de cellules Jurkat transfectées avec ce récepteur. Les cellules transfectées

sont plus résistantes à l'apoptose que les cellules natives, suggérant un rôle du PBR dans la protection contre les radicaux libres et la dépolarisation de la membrane mitochondriale interne induite par les UV¹⁵⁶.

Les données actuelles concernant le rôle du PBR dans la mort cellulaire peuvent être résumées comme suit :

1. Plusieurs ligands du PBR, lorsqu'ils sont utilisés dans une gamme de concentrations correspondant à leur affinité pour le récepteur, semblent spécifiquement protéger les cellules contre l'apoptose.
2. L'expression du PBR elle-même pourrait jouer un rôle protecteur contre certains activateurs de l'apoptose dont les radiations ultraviolettes.
3. La plupart des ligands du PBR, lorsqu'ils sont utilisés à hautes concentrations, sont capables soit d'induire, soit de sensibiliser les cellules tumorales à l'apoptose. Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent ces propriétés ne sont pas encore connus.

I.2.2. Autres fonctions présumées du PBR

<i>Fonction</i>	<i>Arguments expérimentaux</i>
Synthèse des hormones stéroïdes et importation du cholestérol dans la mitochondrie	<ol style="list-style-type: none"> 1. Certains ligands du PBR peuvent accroître la production d'hormones stéroïdes par des lignées de cellules de Leydig¹⁵⁷. 2. L'inactivation de l'expression du PBR par recombinaison homologe inhibe la production de stéroïdes par ces même cellules, probablement en réduisant l'importation de cholestérol dans la mitochondrie¹⁵⁸. 3. Une autre étude d'inhibition de l'expression du PBR par des ARN antisens exprimés sous la dépendance d'un promoteur activé par l'AMPc a conclu à un effet inverse. Il s'agit probablement dans cette étude d'un effet stéroïdogène propre de l'AMPc¹⁵⁹.
Régulation de la respiration cellulaire	<ol style="list-style-type: none"> 1. Plusieurs ligands du PBR, dont le RO 5-4864 et le PK 11195 semblent inhiber la respiration cellulaire¹⁶⁰. 2. Cette inhibition pourrait être liée à une réduction du fonctionnement du complexe II des chaînes respiratoires, la succinate-cytochrome c oxydoreductase¹⁶¹. 3. Une autre hypothèse est qu'elle soit liée à l'induction par les ligands du PBR d'une fermeture du VDAC et de l'ANT, deux protéines associées au PBR et essentielles dans l'importation de l'ADP au niveau mitochondrial¹³⁶. 4. Le PBR présente un taux d'homologie significatif et peut se substituer à la fonction de la <i>Tryptophan Rich Sensory Protein</i> (TsPO) exprimée par certaines bactéries photosynthétiques. Il pourrait donc être sensible à l'oxygénation du milieu¹⁶².
Biosynthèse de l'hème	<ol style="list-style-type: none"> 1. La protoporphyrine IX, ainsi que d'autres précurseurs de l'hème ont été identifiés en tant que ligands du PBR. Les données expérimentales supportant un rôle réel de ce récepteur dans la voie biosynthétique de l'hème sont toutefois indirectes et peu convaincantes^{136;137}.

Prolifération et différenciation cellulaire	<ol style="list-style-type: none">1. La plupart des ligands du PBR semblent capables d'influencer la prolifération et la différenciation de plusieurs types cellulaires par un mécanisme probablement indépendant de leur interaction avec ce récepteur^{136,163}.2. D'une façon générale, le PBR est plus abondamment exprimé par les cellules dont la prolifération est importante, comme les cellules tumorales, et le taux d'expression a pu être corrélé à l'agressivité de la prolifération dans plusieurs modèles. Les mécanismes reliant l'expression du PBR à la prolifération cellulaire ne sont pas encore identifiés¹⁶⁴⁻¹⁶⁹.
---	--

I.3. Les ligands synthétiques du PBR

A côté des benzodiazépines, plusieurs classes de molécules synthétiques se lient au PBR. Nous décrivons ici brièvement les principaux ligands synthétiques du PBR utilisés à l'heure actuelle.

I.3.1. Les benzodiazépines

Le diazépam (Valium[®]) lie les récepteurs périphérique et central avec la même affinité. A l'inverse, son dérivé 4'-chloro, le 4'-chlorodiazépam ou RO 5-4864 lie le PBR avec une affinité de l'ordre du nanomolaire, alors que des concentrations micromolaires sont nécessaires pour obtenir une liaison au récepteur central. Le clonazépam, à l'inverse, possède une affinité importante pour le récepteur central, et faible pour le PBR.

I.3.2. Les isoquinolines carboxamides

Il s'agit d'une famille de composés qui possèdent un noyau 2-phényl isoquinoline et une chaîne de type amine alkylée. Le principal représentant de ce groupe est le PK 11195. Il possède également une affinité de l'ordre du nanomolaire pour le PBR et sa liaison au récepteur central est négligeable¹³⁶.

I.3.3. Les autres ligands synthétiques

A côté du RO 5-4864 et du PK 11195 qui sont les deux ligands du PBR les plus utilisés, de nombreuses autres molécules ont également été identifiées en tant que ligand de ce récepteur et commencent à être étudiées. Parmi les indolacétamides, le FGIN 1-27 est le plus utilisé^{170,171}. Diverses molécules comme le N-(4-chloro-2-phenoxyphenyl)-N-(2-isopropoxybenzyl)acetamide (DAA1097) et le N-(2,5-dimethoxybenzyl)-N-(5-fluoro-2-phenoxyphenyl)acetamide (DAA1106)¹⁷², le 7-chloro-N,N,5-triméthyl-4-oxo-3-phényl-3,5-dihydro-4H-pyridazino[4,5-b]in dole-1-acétamide (SSR180575)¹⁷³ et les N,N-diéthyl-(2-arylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)acétamides¹⁷⁴ sont aussi capables de se fixer au PBR. La plupart de ces molécules n'ont toutefois été que très peu étudiées et les conséquences biologiques de leur interaction avec ce récepteur ne sont pas connues. Elles pourraient constituer des outils pharmacologiques intéressants dans les années à venir.

I.4. Les ligands endogènes du PBR

A côté de ces ligands synthétiques, plusieurs molécules endogènes interagissent également avec le PBR. Pour la plupart d'entre elles, la signification de cette interaction n'est pas connue. Les deux principaux ligands endogènes sont le « *diazepam binding inhibitor* » (DBI), un polypeptide de 86 acides aminés, et la protoporphyrine IX¹⁶¹. D'autres « activités » capables de déplacer la liaison spécifique de certains ligands du PBR ont été isolées à partir de divers tissus, mais les molécules qui en sont responsables n'ont jamais été identifiées¹⁵⁷. Plus récemment, une nouvelle protéine, appelée PRAX1 (Peripheral Benzodiazepine Receptor Associated Protein 1), a été découverte par la méthode du double hybride. Cette protéine est abondamment exprimée dans le système nerveux et plus particulièrement dans le système mésolimbique. Sa fonction n'est pas encore connue¹⁷⁵.

II. Contribution personnelle : étude du mécanisme d'action des ligands du PBR

II.1. Objectifs

Avant de rechercher une liaison de la β CCB au PBR, il nous a paru essentiel d'essayer de clarifier le rôle de ce récepteur dans la survie cellulaire afin de déterminer s'il constituait réellement une cible moléculaire capable d'activer des cascades apoptotiques après liaison d'un de ses ligands.

Pour réaliser cette étude, nous avons choisi deux des ligands les plus couramment utilisés, le RO 5-4864 et le FGIN 1-27, qui fixent le PBR avec une affinité nanomolaire. Nous avons comparé la toxicité de ces molécules sur deux lignées cellulaires différentes : les SK-N-BE, une lignée de neuroblastome d'origine humaine qui exprime abondamment le PBR et les Jurkat, une lignée de lymphome également d'origine humaine dépourvue de toute expression du PBR¹⁵⁶.

II.2. Résumé des résultats et discussion (Publication 4)

- 1. Les cellules SK-N-BE expriment le PBR alors que les cellules Jurkat en sont dépourvues (Fig. 26 A et B).**
- 2. Le RO 5-4864 et le FGIN 1-27, utilisés à des concentrations de 1 à 150 μ M, induisent la mort de ces deux types cellulaires de façon dose-dépendante.**

Nous avons tout d'abord observé que les concentrations de RO 5-4864 et de FGIN 1-27 nécessaires pour induire la mort des cellules sont donc nettement supérieures à celles saturant le PBR (Fig. 26 C et D). Ensuite, nous avons montré que ces deux molécules conservent leur toxicité pour des cellules qui n'expriment pas le PBR. Nous pouvons dès lors conclure que cet effet est très probablement indépendant de leur liaison à ce récepteur.

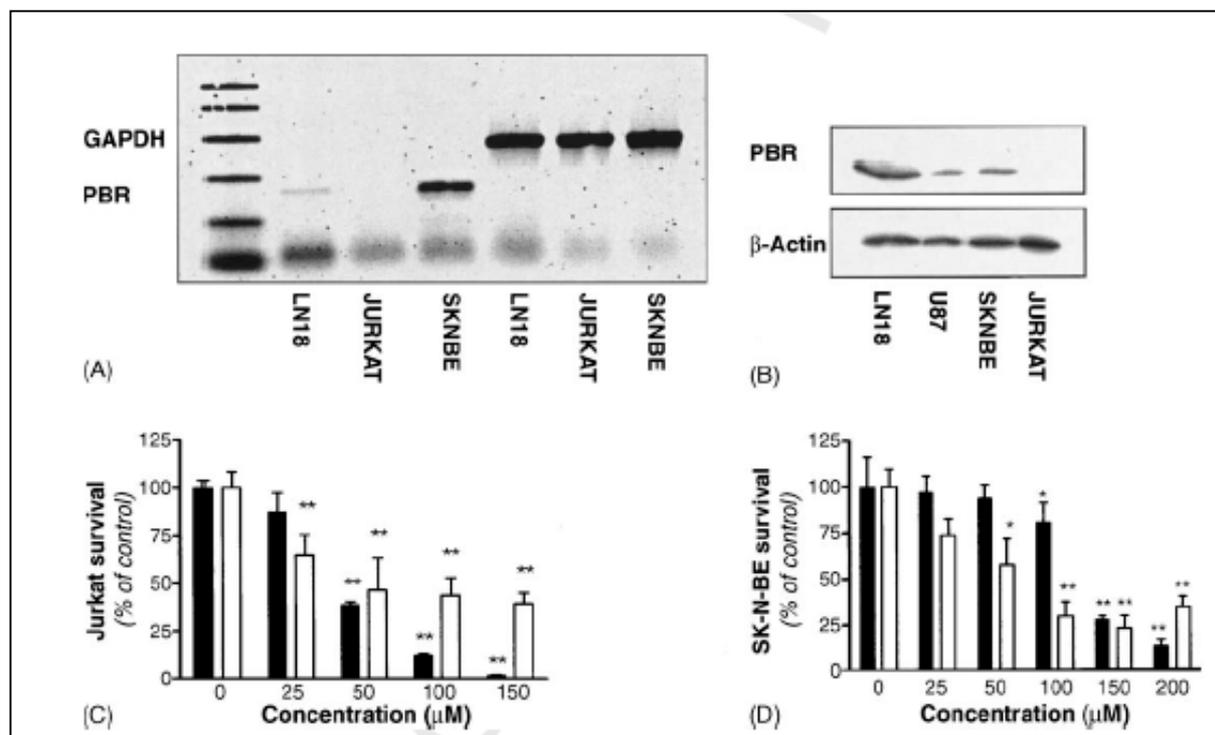


Figure 26: Illustration par RT-PCR (A) et western blot (B) de l'absence d'expression du PBR dans les cellules Jurkat et de sa présence dans les cellules SK-N-BE. Illustration de la toxicité de deux ligands du PBR, le RO 5-4864 (barres noires) et le FGIN 1-27 (barres blanches) dans les cellules Jurkat (C) et dans les cellules SK-N-BE (D).

3. La mort induite par le RO 5-4864 est de nature apoptotique dans les cellules Jurkat alors qu'elle est plutôt de type nécrotique dans les cellules SK-N-BE.

Lorsqu'elles meurent suite à un traitement par le RO 5-4864, les morphologies des cellules Jurkat et SK-N-BE sont radicalement différentes. Les cellules Jurkat présentent une condensation nucléaire évoquant un processus apoptotique, alors que les SK-N-BE ont un aspect nécrotique. Nous avons confirmé cette hypothèse en étudiant la dégradation de l'ADN et le clivage de PARP après l'exposition de ces deux lignées cellulaires au RO 5-4864. Dans les cellules Jurkat, ce toxique induit en effet une fragmentation internucléosomique de l'ADN ainsi qu'un clivage de PARP typique d'une mort apoptotique. A l'inverse, dans les SK-N-BE traitées de la même façon, la dégradation de l'ADN paraît non spécifique et le clivage de PARP est différent, évoquant plutôt une mort par nécrose (Fig. 27).

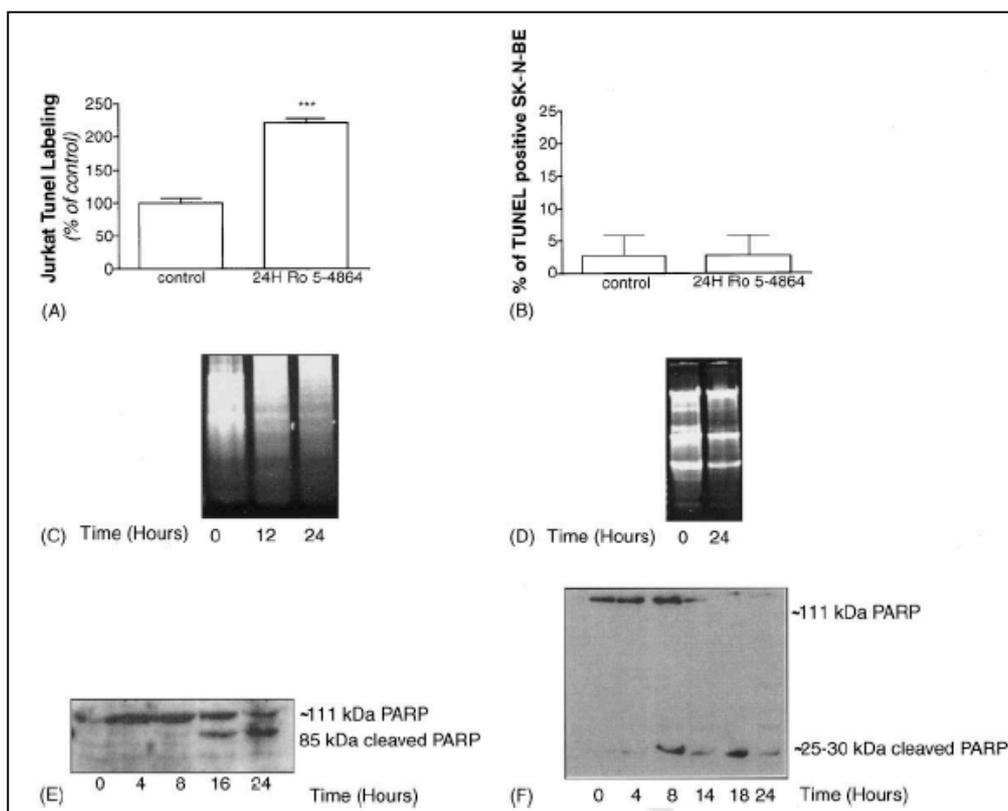


Figure 27 : Dans les cellules Jurkat, l'exposition au RO 5-4864 induit une mort apoptotique comme en témoigne l'apparition d'une fragmentation internucléosomique de l'ADN démontrée par la positivité du marquage TUNEL (A) et l'échelonnage des fragments après migration sur gel d'agarose (C) ainsi que par le clivage de la protéine PARP en un fragment de 85 kDa (E). Dans les cellules SK-N-BE, la mort induite par le RO 5-4864 est plutôt nécrotique. Le marquage TUNEL est négatif (B), le clivage de l'ADN est non spécifique (D) et la dégradation de la protéine PARP donne lieu à la formation d'un fragment de 30 kDa.

- 4. Dans les cellules Jurkat, le RO 5-4864 induit une activation des caspases 8, 9 et 3. Les cellules SK-N-BE sont déficientes en pro-caspases 8 et 9. De surcroît, aucune activation de la caspase 3 n'est observable après traitement de ces cellules par le RO 5-4864.**

Afin de confirmer définitivement que la mort des cellules Jurkat induite par le RO 5-4864 est bien de nature apoptotique, nous avons recherché une activation des caspases. Ces enzymes sont en effet des acteurs cardinaux de l'apoptose. Dans les cellules Jurkat traitées par le RO 5-4864, les caspases 3, 8 et 9 sont activées dès 16 heures après le début de l'exposition. Dans les cellules SK-N-BE, aucune activation des caspases n'est induite par ce toxique (Fig. 28). En outre, ces cellules n'expriment pas les pro-enzymes des caspases 8 et 9. L'absence d'activation des caspases renforce l'hypothèse d'une mort nécrotique dans les cellules SK-N-BE.

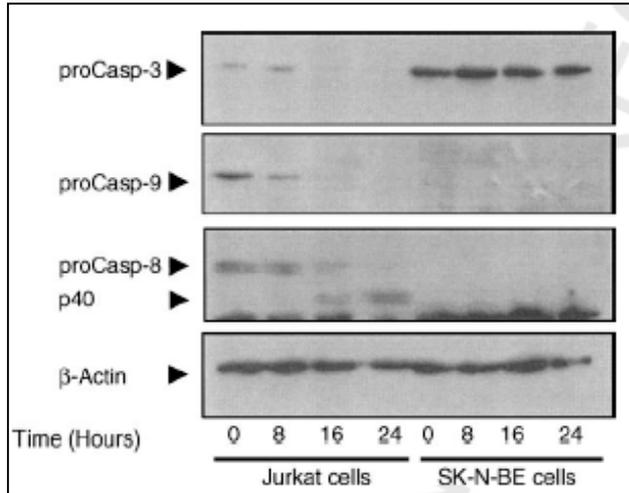


Figure 28: Illustration de l'activation des caspases-3, -8 et -9 dans les cellules Jurkats et SK-N-BE au cours d'un traitement par RO 5-4864 à une concentration de 150 μ M. L'activation des caspases est reflétée soit par la disparition de la pro-enzyme, soit par l'apparition d'un fragment clivé. Le RO 5-4864 n'active pas les caspases dans les cellules SK-N-BE alors que dans les cellules Jurkat, il active les caspases-3, -8 et -9.

5. Dans les cellules Jurkat, un inhibiteur sélectif de la caspase 8 protège contre la toxicité du RO 5-4864 et prévient l'activation des caspases 3 et 9 ainsi que la dégradation de l'ADN. Ce même inhibiteur est inactif dans les cellules SK-N-BE.

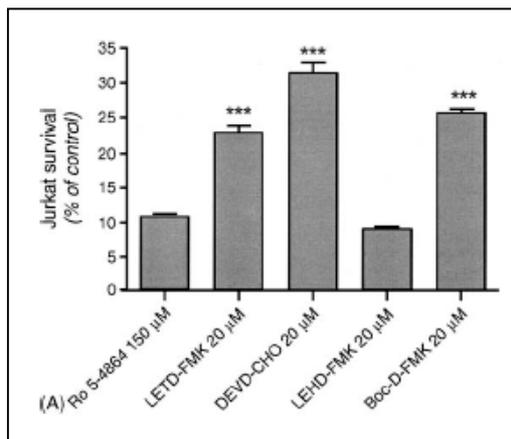


Figure 29: Les inhibiteurs de caspase-8 et -3 ainsi que l'inhibiteur de pancaspase, respectivement désignés LETD-FMK, DEVD-FMK et Boc-D-FMK protègent les cellules Jurkat contre la toxicité du Ro 5-4864.

Nous avons étudié la signification de l'activation des caspases dans les cellules Jurkat traitées par RO 5-4864 en utilisant des inhibiteurs spécifiques de différentes caspases. Parmi les inhibiteurs testés, seuls les inhibiteurs des caspases 3 et 8 protègent efficacement les cellules contre la toxicité du RO 5-4864 (Fig. 29). L'activation de la caspase 9 est donc probablement un phénomène secondaire dans ce modèle. L'effet protecteur de l'inhibiteur de la caspase 3 signifie que le RO 5-4864 induit une cascade apoptotique au moins partiellement dépendante des caspases. Quant à la protection apportée par l'inhibiteur de la caspase 8, elle suggère que cette caspase joue un rôle dans l'activation de l'apoptose par le RO 5-4864. Nous avons confirmé cette hypothèse en montrant que l'inhibition de la caspase 8 bloque l'activation des caspases 9 et 3 ainsi que le clivage de PARP et la fragmentation internucléosomique de l'ADN induite par le RO 5-

4864.

6. Le RO 5-4864 induit une dépolarisation de la membrane mitochondriale et une libération cytosolique du cytochrome c qui survient tardivement après le début du traitement dans les cellules Jurkat et précocement dans les cellules SK-N-BE.

La mitochondrie, de part son rôle de pourvoyeur énergétique et sa capacité à séquestrer des facteurs pro-apoptotiques, joue un rôle essentiel dans la régulation de la mort cellulaire. Elle se trouve aux confins de l'apoptose et de la nécrose. Les phénomènes mitochondriaux accompagnant la mort cellulaire ont donc un intérêt particulier dans l'étude de la toxicité du RO 5-4864.

Dans les cellules Jurkat, le RO 5-4864 induit une libération cytosolique du cytochrome c (Fig. 30A) et une dépolarisation de la membrane mitochondriale (Fig. 30C) qui est tardive. Elle survient après les premiers signes d'activation des caspases. En outre, deux inhibiteurs du mPTP, la cyclosporine A et l'acide bongkrélique, sont sans effet sur la toxicité du RO 5-4864 dans ces cellules (Fig. 31 E). Dès lors, nous pensons que les altérations mitochondriales observées dans les cellules Jurkat sont des phénomènes secondaires et n'interviennent pas dans le déclenchement de la cascade de mort induite par le RO 5-4864. L'atteinte de l'intégrité des membranes mitochondriales dont témoigne la chute du $\Delta\psi_m$ et la libération du cytochrome c est probablement liée à l'altération de certaines enzymes des chaînes respiratoires par des caspases activées¹⁷⁶.

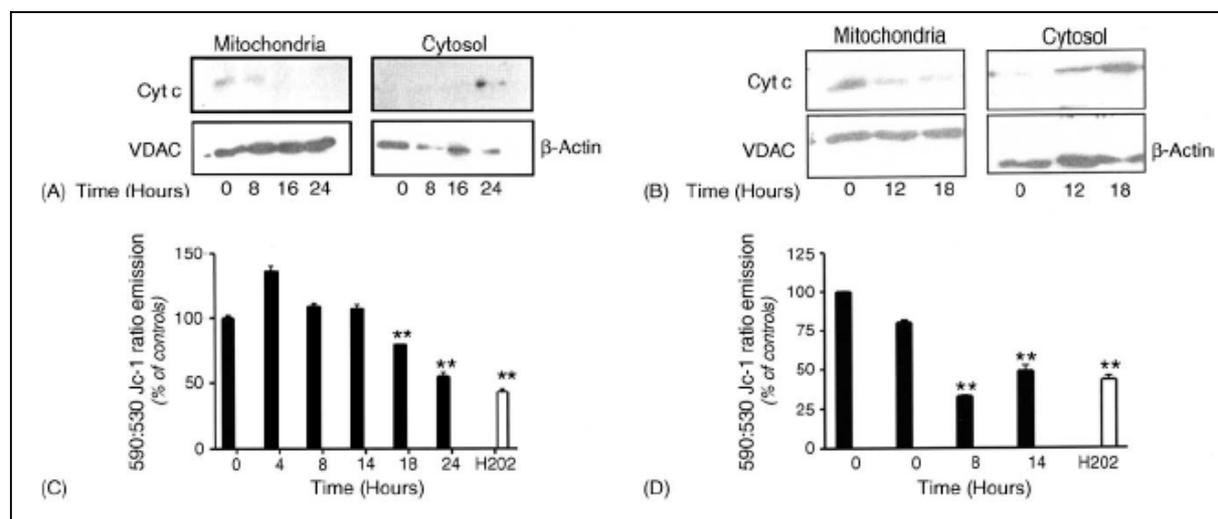


Figure 30: Illustration de la libération cytosolique du cytochrome c (A et B) et de la dépolarisation de la membrane mitochondriale mise en évidence par le diminution du ratio d'émission 590/530 du fluorochrome JC-1 (C-D) au cours d'une exposition au RO 5-4864. Dans les cellules Jurkat, la libération du cytochrome c dans le cytosol (A) et la dépolarisation de la membrane mitochondriale (C) sont des phénomènes tardifs (16-24 heures). Dans les cellules SK-N-BE (B et D), ces phénomènes sont plus précoces (8-12 heures).

Par contre, dans les cellules SK-N-BE, ces phénomènes sont précoces et d'emblée importants. Ils pourraient par conséquent refléter une ouverture massive du mPTP (Fig. 30 B et D).

Toutefois, deux inhibiteurs du mPTP, l'acide bongkréique et la cyclosporine A, sont également inactifs contre la toxicité du RO 5-4864 dans ces cellules (Fig. 31 F).

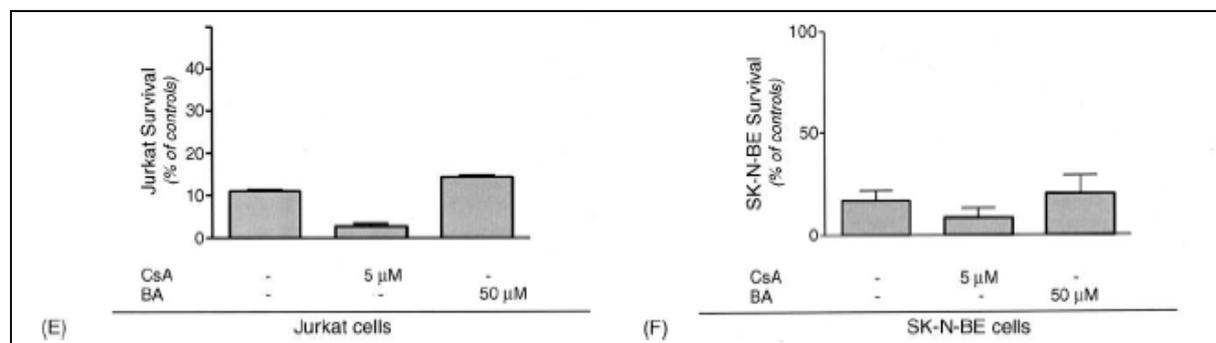
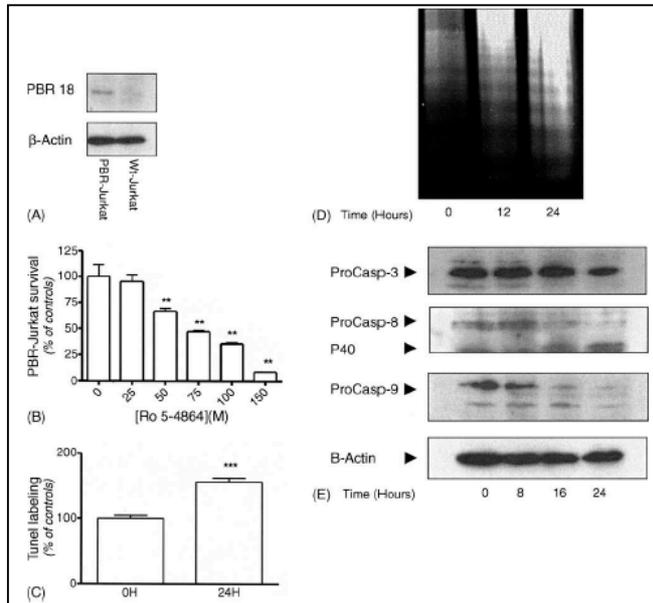


Figure 31: Deux inhibiteurs du mPTP, la cyclosporine A (CsA) et l'acide bongkréique (BA) ne protègent ni les cellules Jurkat, ni les cellules SK-N-BE contre la toxicité du RO 5-4864.

Deux hypothèses pourraient expliquer cette absence d'effet. Premièrement, la mort induite par le RO 5-4864 pourrait dépendre de l'induction d'un mPTP non régulé ou régulé de façon aberrante et donc insensible aux inhibiteurs habituels. Ces phénomènes ont été décrits dans d'autres modèles dont certains, d'ailleurs, emploient des ligands du PBR^{177;178}. L'autre hypothèse consiste à penser que les altérations mitochondriales observées, bien que causales dans la mort des cellules SK-N-BE, ne sont pas le reflet d'une ouverture du mPTP. Une inhibition des chaînes respiratoires et/ou une production accrue de radicaux libres pourraient en effet être responsables de nos observations et sont des mécanismes d'action potentiels du RO 5-4864 (Fig. 15).

7. La transfection de cellules Jurkat avec le PBR n'influence pas la nature de leur réponse au traitement par le RO 5-4864.



fragmentation internucléosomique de l'ADN témoignant d'une mort apoptotique (Fig. 32 C et

Figure 32: Après exposition au RO 5-4864, les cellules Jurkat transfectées avec le PBR se comportent comme les cellules Jurkat sauvages. (B) Elles subissent une mort cellulaire dose-dépendante (C-D), une fragmentation internucléosomique de l'ADN comme en témoigne la positivité du marquage TUNEL et l'échelonnage des fragments d'AND après migration sur gel d'agarose ainsi qu'une activation des caspases -8, -3 et -9.

Une autre façon d'expliquer la différence de réponse au RO 5-4864 existant entre les cellules Jurkat et SK-N-BE est la présence du PBR dans l'un de ces deux types cellulaires seulement. Nous avons donc étudié la toxicité du RO 5-4864 dans une lignée de cellules Jurkat exprimant le PBR suite à une transfection stable (Fig. 32 A). Après traitement par le RO 5-4864, ces cellules se comportent de façon parfaitement identique à la lignée sauvage correspondante. Elles subissent en effet une toxicité dose dépendante (Fig 32 B) ainsi qu'une activation des caspases-8 et -9 (Fig. 32 E). Nous en concluons que le PBR n'est pas responsable de la différence de réponse au RO 5-4864 observée entre les cellules Jurkat et SK-N-BE.

II.3. Conclusions

Comme nous l'avons mentionné précédemment, au cours de cette partie de notre travail, nous avons formellement démontré que l'apoptose induite par certains ligands du PBR n'est pas liée à leur fixation sur ce récepteur. En outre, nous avons observé que le mécanisme de la mort induite par RO 5-4864 peut différer selon le type cellulaire étudié. Nous avons enfin montré que la présence du PBR n'influence en rien la nature de la mort induite par le RO 5-4864.

A l'heure actuelle, nous ne connaissons pas le mécanisme par lequel cette molécule active la caspase 8 dans les cellules Jurkat. Nous pensons qu'il est indirect. Une explication élégante consiste à imaginer que le RO 5-4864 accroît la production de radicaux libres, ce qui peut induire l'expression de multiples gènes, dont celui du ligand de FAS, un des principaux activateurs de la caspase 8. Le facteur de transcription NFκB est responsable des modifications transcriptionnelles induites par les radicaux libres (Fig. 34).

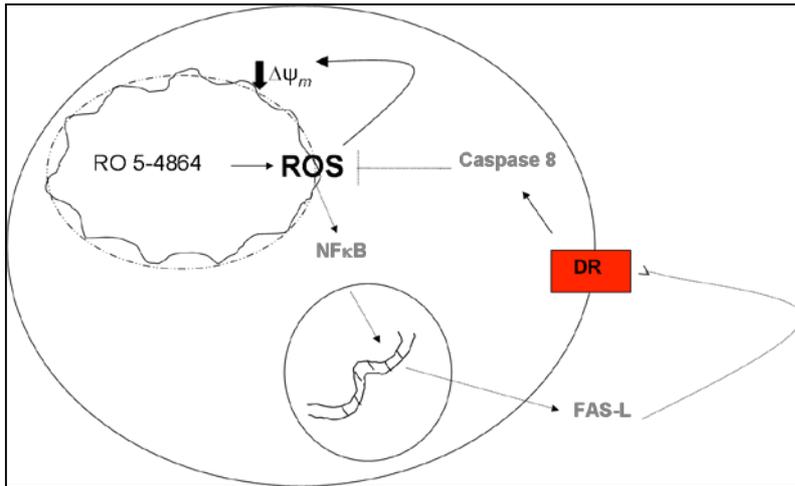


Figure 33: Mécanisme d'action présumé du RO 5-4864 dans les SK-N-BE. DR = Death Receptor. ROS = Reactive Oxygen Species. Explications dans le texte.

En leur absence, la production d'espèces réactives de l'oxygène en excès pourrait alors conduire à la nécrose¹⁰⁰. L'intérêt de cette hypothèse par rapport à notre travail est l'absence d'expression de pro-caspase 8 par les cellules SK-N-BE qui pourrait être responsable d'un

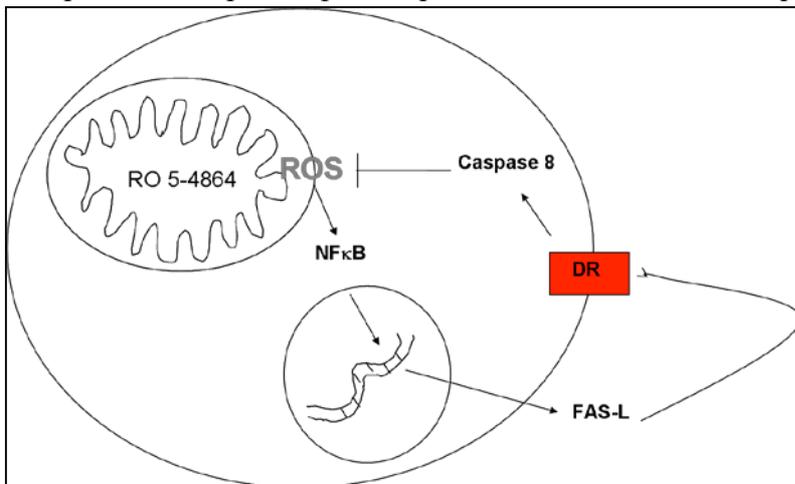


Figure 34 : Mécanisme d'action présumé du RO 5-4864 dans les cellules Jurkats. DR = Death Receptor. ROS = Reactive Oxygen Species. Explications dans le texte.

défaut de protection contre les espèces activées de l'oxygène. Dans ces cellules, le RO 5-4864 déclencherait une augmentation de la production de radicaux libres telle qu'ils provoquent une atteinte directe de l'intégrité de la membrane mitochondriale et une mort nécrotique (Fig 33).

L'hypothèse des radicaux libres est particulièrement séduisante. En effet, dans certains modèles de toxicité du TNF_{α} , ils jouent un rôle important. En outre, lorsque la caspase 8 est inhibée ou absente, la mort induite par le TNF_{α} , qui est habituellement de nature apoptotique, peut être convertie en nécrose. Ces observations ont fait naître une hypothèse selon laquelle les caspases pourraient jouer un rôle protecteur par rapport à la toxicité des radicaux libres.

A l'heure actuelle, la cible moléculaire du RO 5-4864 et des autres ligands du PBR qui est responsable du déclenchement de la mort cellulaire induite par ces agents reste inconnue. Il est même possible qu'elle diffère selon les molécules et selon les types cellulaires.

**Publication IV : Peripheral benzodiazepine receptor (PBR)
ligands induce cell death through a PBR-independent
mechanism**

Conclusions générales

Avant toute autre chose, ce travail illustre l'extraordinaire importance, complexité et diversité des phénomènes de mort cellulaire. Au cours de leur évolution, les organismes uni- et puis multicellulaires ont en effet été pourvus d'un nombre croissant de mécanismes moléculaires leur permettant de réguler la survie des cellules qui les constituent. Cette fonction de régulation semble d'abord avoir un rôle physiologique. Au même titre que la prolifération et la différenciation, la mort de cellules est, en effet, nécessaire au façonnement des organes chez l'embryon et le fœtus, à l'acquisition de la tolérance immunitaire, au renouvellement des tissus dans l'organisme adulte... Malheureusement, dans certaines circonstances, la machinerie qui est aux commandes de la mort cellulaire s'enraye et provoque des affections, entre autres, dysimmunes, néoplasiques ou encore neurodégénératives. Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans diverses situations impliquant la mort cellulaire, devrait permettre de mieux comprendre la manière dont l'organisme se développe et donc, les anomalies pouvant survenir au cours de ce développement. Elle aiderait aussi à mieux contrôler certaines affections caractérisées par un excès de mort cellulaire, comme les maladies neurodégénératives, ou encore par un défaut de mort cellulaire, comme certaines maladies auto-immunes et tumorales. Le défi est toutefois très ambitieux.

Il y a quelques années, dans le laboratoire, les propriétés neurotoxiques de la β CCB, un agent alors principalement connu comme effecteur allostérique négatif des récepteurs centraux des benzodiazépines, ont été pour la première fois mises en évidence. Les mécanismes moléculaires de cette toxicité nous ont paru intéressants à étudier parce que, d'une part, la β CCB a été isolée du système nerveux des mammifères à plusieurs reprises et que, d'autre part, sa structure moléculaire est similaire à celle de neurotoxines qui jouent probablement un rôle dans la dégénérescence des neurones dopaminergiques responsable de la maladie de Parkinson. Nos résultats suggèrent que la β CCB, suite à sa liaison à un récepteur intracellulaire, active la voie mitochondriale de l'apoptose. Compte tenu de sa capacité à se lier au récepteur central des benzodiazépines, nous avons émis l'hypothèse que la β CCB pourrait également se fixer au récepteur périphérique des benzodiazépines, et que cette liaison pourrait être responsable de sa toxicité. Avant d'étudier spécifiquement la liaison de la β CCB au PBR, nous avons voulu clarifier le rôle de ce récepteur dans la régulation de la survie et de la mort cellulaire. Les données existant dans la littérature sont en effets contradictoires. Nos résultats démontrent que la toxicité de deux ligands pharmacologiques très utilisés du PBR est indépendante de leur liaison à ce récepteur. En outre, le Ro 5-4864 est capable d'induire la mort cellulaire, par apoptose ou par nécrose en fonction du type cellulaire.

Ces données ouvrent plusieurs perspectives de recherches. Tout d'abord, il nous paraît essentiel de mieux clarifier le rôle des agents neurotoxiques dans la physiopathologie des maladies neurologiques. L'étiologie de la plupart de ces affections, et plus particulièrement des maladies neurodégénératives, reste largement incomprise malgré les progrès effectués récemment. Pourtant, bien comprendre l'origine et les mécanismes de la mort des neurones est un pré-requis indispensable, si l'on veut, un jour, les protéger. Depuis la vie embryonnaire

jusqu'à la mort de l'individu, de très nombreux facteurs conditionnent la survie des neurones.

Le rôle de certains gènes est très important, notamment pendant le développement du système nerveux. Au cours de cette période de la vie, l'activité mitotique conduit, en effet, à la formation d'un nombre excessif de cellules neuronales dont certaines seulement survivront jusqu'à l'âge adulte. Les autres sont éliminées en partie grâce à l'activation de cascades de morts par des mécanismes géniques¹⁷⁹.

Les facteurs neurotrophiques jouent également un rôle capital. Ils sont peut être produits par les neurones eux-mêmes, les cellules gliales, ou encore l'organe cible de l'innervation. Leur disponibilité est considérée comme un élément déterminant dans la régulation du nombre de neurones survivants. C'est par ce mécanisme que l'importance de l'innervation est adaptée à la taille de l'organe cible¹⁸⁰.

L'activité neuronale, de part la dépolarisation qu'elle provoque, régule aussi positivement la survie de nombreux types neuronaux¹⁷⁹.

Intuitivement, on peut imaginer que les facteurs responsables de la mort prématurée de certaines populations neuronales - et de ses conséquences pathologiques - agissent à l'inverse de ceux qui conditionnent leur survie. Ainsi, l'expression inadéquate de certains gènes comme le précurseur de la protéine amyloïde, ou le gain de fonction de protéines mutées comme la superoxyde dismutase, sont respectivement impliqués dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer¹⁸¹ et de la sclérose latérale amyotrophique¹⁸². La perte de fonction d'enzymes comme la Parkine et l'UCL-1 (Ubiquitine C-terminal Ligase L1), qui participent au recyclage et à la dégradation des protéines, est responsable de formes génétiques de la maladie de Parkinson¹⁰³. Compte tenu du rôle important des facteurs neurotrophiques dans la survie des neurones et dans le maintien de leurs connexions synaptiques, un déficit quantitatif ou fonctionnel de ces facteurs est susceptible d'entraîner une augmentation de la mort neuronale. De nombreux travaux expérimentaux font d'ailleurs état d'une altération de la distribution et d'un déficit quantitatif en facteurs neurotrophiques dans les maladies neurodégénératives¹⁸³. D'autres rapportent l'efficacité thérapeutique d'un apport exogène de facteurs neurotrophiques¹⁸⁴. A l'heure actuelle, il existe toutefois peu de données supportant un rôle causal d'un déficit en facteurs trophiques dans la physiopathologie de maladies neurologiques.

L'exposition à des agents neurotoxiques est un autre élément potentiellement à l'origine de morts neuronales¹⁸⁵. La recherche des substances neurotoxiques dans l'environnement, l'étude de leur formation, de leur distribution et de leur métabolisation dans l'organisme humain, ainsi que de leur mécanisme d'action, constitue donc un axe de recherche susceptible de contribuer à une meilleure compréhension des dégénérescences neuronales. C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail sur la β CCB. En outre, et à notre sens, l'étude du mécanisme d'action des agents neurotoxiques dépasse ce cadre. Elle est en effet susceptible de conduire à la découverte de nouveaux récepteurs et de nouvelles cascades biochimiques conduisant à la mort cellulaire, qui sont autant de cibles thérapeutiques potentielles. La

recherche de la cible moléculaire des agents neurotoxiques en général, et, dans le cadre de ce mémoire, de la β CCB, est donc un second objectif prioritaire.

Notre travail sur la toxicité des ligands pharmacologiques du PBR illustre néanmoins la difficulté de ce type d'objectif, et met en exergue les limites inhérentes à une approche purement pharmacologique. Il remet en question la notion de spécificité des ligands pharmacologiques dont l'étude est exclusivement basée sur des expériences de liaison et de compétition. Nous avons en effet montré qu'il convient de s'assurer que la présence du récepteur présumé d'une molécule soit bien indispensable pour que ses effets biologiques aient lieu. Nos données incitent à rechercher un autre récepteur pour le Ro 5-4864 et le FGIN 1-27, susceptible d'être en relation avec leur cytotoxicité. Compte tenu de la puissance et de la relative spécificité de la toxicité de ces agents vis-à-vis des cellules cancéreuses, ce récepteur pourrait constituer un outil pharmacologique important dans la recherche de nouveaux médicaments chimiothérapeutiques ou chimiosensibilisants¹⁴⁸.

En ce qui concerne le PBR lui-même, il reste, bien entendu, un récepteur particulièrement attractif. Son rôle éventuel dans la régulation de la perméabilité de la membrane mitochondriale, et donc de la survie cellulaire, doit néanmoins être reconsidéré. Nous savons que ce récepteur interagit avec des membres du mPTP comme le VDAC¹⁶¹. Il est très probable qu'il ait de nombreuses autres interactions protéiques, notamment avec les membres de la famille de Bcl-2. Identifier ces interactions, étudier leur évolution au cours de divers modes de perméabilisation de la membrane mitochondriale et, tenter ensuite de les manipuler, nous paraît une approche élégante pour mieux comprendre le rôle de ce récepteur afin d'éventuellement pouvoir l'exploiter dans une stratégie de cytotoxicité ou de cytoprotection.

Enfin, la nature de la mort cellulaire induite par le Ro 5-4864, respectivement dans les cellules Jurkat et SK-N-BE renforce l'idée selon laquelle il existe autant de façons pour une cellule de mourir que de cascades biochimiques pouvant conduire à cette mort, réalisant un continuum entre les deux extrémités que constituent l'apoptose et la nécrose. A ce stade, nous ne pouvons que formuler des hypothèses pour expliquer que la mort cellulaire induite par un même agent cytotoxique peut être radicalement différente d'un type cellulaire à l'autre. Il est logique de penser que tout agent toxique agit, *in fine*, en rompant l'équilibre qui existe entre l'activation des mécanismes de mort et de survie cellulaire qui caractérise les cellules vivantes. A plusieurs reprises, nous avons illustré dans ce travail que, quel que soit l'objet de cette rupture, la cellule peut mettre en œuvre des dispositifs de compensation. Ainsi, la surproduction de radicaux libres peut être neutralisée par les systèmes de détoxification enzymatique, l'activation des caspases peut être endiguée par leurs inhibiteurs endogènes, le blocage des chaînes respiratoires peut être compensé par une augmentation de l'activité glycolytique... La nature de la mort cellulaire déclenchée par un agent agresseur va donc dépendre, d'une part, du mécanisme d'action de cet agent et, d'autre part, des capacités de la

cellule à compenser le déséquilibre qu'il induit. Ces capacités sont fonction des propriétés intrinsèques du type cellulaire concerné, mais aussi, du contexte dans lequel la cellule subit son agression. L'étude des capacités de réaction de certains types cellulaires, et en particulier neuronaux, à une agression, devrait aider à mieux comprendre leur vulnérabilité, et donc, les raisons qui conduisent à leur dégénérescence préférentielle dans certaines maladies.

Bibliographie

1. D. L. Vaux and S. J. Korsmeyer, *Cell* 96, 245-254 (1999).
2. F. Rieux-Laucat, A. Fischer, F. L. Deist, *Curr.Opin.Immunol.* 15, 325-331 (2003).
3. M. P. Mattson, *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 1, 120-129 (2000).
4. M. Montal, *Biochim.Biophys.Acta* 1366, 113-126 (1998).
5. J. A. Hickman, *Curr.Opin.Genet.Dev.* 12, 67-72 (2002).
6. J. S. Bertram, *Mol.Aspects Med.* 21, 167-223 (2000).
7. J. F. Kerr, *J.Pathol.* 105, 13-20 (1971).
8. A. Balla, B. Toth, G. Timar, J. Bak, P. Krajcsi, *Biochem.Pharmacol.* 61, 769-777 (2001).
9. D. Kanduc et al., *Int.J.Oncol.* 21, 165-170 (2002).
10. S. Y. Proskuryakov, A. G. Konoplyannikov, V. L. Gabai, *Exp.Cell Res.* 283, 1-16 (2003).
11. M. P. Mattson, C. Culmsee, Z. F. Yu, *Cell Tissue Res.* 301, 173-187 (2000).
12. P. Nicotera and G. Melino, *Oncogene* 23, 2757-2765 (2004).
13. M. G. Grutter, *Curr.Opin.Struct.Biol.* 10, 649-655 (2000).
14. N. A. Thornberry and Y. Lazebnik, *Science* 281, 1312-1316 (1998).
15. W. C. Earnshaw, L. M. Martins, S. H. Kaufmann, *Annu.Rev.Biochem.* 68, 383-424 (1999).
16. D. W. Chang, Z. Xing, V. L. Capacio, M. E. Peter, X. Yang, *EMBO J.* 22, 4132-4142 (2003).
17. D. D. Newmeyer and S. Ferguson-Miller, *Cell* 112, 481-490 (2003).
18. E. Szegezdi, U. Fitzgerald, A. Samali, *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1010, 186-194 (2003).
19. M. Chawla-Sarkar et al., *Apoptosis.* 8, 237-249 (2003).
20. X. Yang et al., *Cancer Res.* 63, 1122-1129 (2003).
21. A. Iolascon et al., *Cancer Genet.Cytogenet.* 146, 41-47 (2003).
22. D. Shim et al., *Arch.Biochem.Biophys.* 425, 214-220 (2004).
23. M. Alvarado-Kristensson et al., *J.Exp.Med.* 199, 449-458 (2004).
24. A. M. Verhagen, E. J. Coulson, D. L. Vaux, *Genome Biol.* 2, REVIEWS3009 (2001).
25. H. R. Stennicke, C. A. Ryan, G. S. Salvesen, *Trends Biochem.Sci.* 27, 94-101 (2002).
26. U. Fischer, R. U. Janicke, K. Schulze-Osthoff, *Cell Death.Differ.* 10, 76-100 (2003).
27. P. Widlak, *Acta Biochim.Pol.* 47, 1037-1044 (2000).
28. D. Nijhawan, N. Honarpour, X. Wang, *Annu.Rev.Neurosci.* 23, 73-87 (2000).
29. S. Nagata, *Exp.Cell Res.* 256, 12-18 (2000).
30. S. Nagata, H. Nagase, K. Kawane, N. Mukae, H. Fukuyama, *Cell Death.Differ.* 10, 108-116 (2003).
31. B. S. Fischer, D. Qin, K. Kim, T. V. McDonald, *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 299, 238-246 (2001).
32. A. Ashkenazi and V. M. Dixit, *Curr.Opin.Cell Biol.* 11, 255-260 (1999).

33. J. F. Curtin and T. G. Cotter, *Cell Signal.* 15, 983-992 (2003).
34. P. W. Dempsey, S. E. Doyle, J. Q. He, G. Cheng, *Cytokine Growth Factor Rev.* 14, 193-209 (2003).
35. A. Krueger, S. Baumann, P. H. Krammer, S. Kirchhoff, *Mol.Cell Biol.* 21, 8247-8254 (2001).
36. R. A. Gottlieb, *FEBS Lett.* 482, 6-12 (2000).
37. G. van Loo et al., *Cell Death.Differ.* 9, 1031-1042 (2002).
38. K. Kuida, *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 32, 121-124 (2000).
39. K. Cain, S. B. Bratton, G. M. Cohen, *Biochimie* 84, 203-214 (2002).
40. E. A. Slee et al., *J.Cell Biol.* 144, 281-292 (1999).
41. C. Cande, F. Cecconi, P. Dessen, G. Kroemer, *J.Cell Sci.* 115, 4727-4734 (2002).
42. C. Cande et al., *Biochimie* 84, 215-222 (2002).
43. X. Saelens et al., *Oncogene* 23, 2861-2874 (2004).
44. J. M. Penninger and G. Kroemer, *Nat.Cell Biol.* 5, 97-99 (2003).
45. D. Arnoult et al., *EMBO J.* 22, 4385-4399 (2003).
46. R. Hegde et al., *J.Biol.Chem.* 277, 432-438 (2002).
47. G. van Loo et al., *Cell Death.Differ.* 8, 1136-1142 (2001).
48. S. Cory and J. M. Adams, *Nat.Rev.Cancer* 2, 647-656 (2002).
49. S. Shimizu, M. Narita, Y. Tsujimoto, *Nature* 399, 483-487 (1999).
50. G. Kroemer and J. C. Reed, *Nat.Med.* 6, 513-519 (2000).
51. J. Yang et al., *Science* 275, 1129-1132 (1997).
52. H. L. Vieira et al., *Oncogene* 21, 1963-1977 (2002).
53. H. Li, H. Zhu, C. J. Xu, J. Yuan, *Cell* 94, 491-501 (1998).
54. J. A. Trapani and V. R. Sutton, *Curr.Opin.Immunol.* 15, 533-543 (2003).
55. T. Kuwana et al., *Cell* 111, 331-342 (2002).
56. S. Desagher et al., *J.Cell Biol.* 144, 891-901 (1999).
57. R. Eskes, S. Desagher, B. Antonsson, J. C. Martinou, *Mol.Cell Biol.* 20, 929-935 (2000).
58. J. C. Martinou and D. R. Green, *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2, 63-67 (2001).
59. M. Grinberg et al., *J.Biol.Chem.* 277, 12237-12245 (2002).
60. N. Brustovetsky, J. M. Dubinsky, B. Antonsson, R. Jemmerson, *J.Neurochem.* 84, 196-207 (2003).
61. M. Saraste, *Science* 283, 1488-1493 (1999).
62. M. Crompton, E. Barksby, N. Johnson, M. Capano, *Biochimie* 84, 143-152 (2002).
63. M. Crompton, *J.Physiol* 529 Pt 1, 11-21 (2000).
64. M. Crompton, *Curr.Med.Chem.* 10, 1473-1484 (2003).
65. M. Zoratti and I. Szabo, *Biochim.Biophys.Acta* 1241, 139-176 (1995).
66. F. Ichas and J. P. Mazat, *Biochim.Biophys.Acta* 1366, 33-50 (1998).
67. J. D. Ly, D. R. Grubb, A. Lawen, *Apoptosis.* 8, 115-128 (2003).
68. J. G. Pastorino et al., *J.Biol.Chem.* 274, 31734-31739 (1999).
69. J. G. Pastorino, S. T. Chen, M. Tafani, J. W. Snyder, J. L. Farber, *J.Biol.Chem.* 273, 7770-7775 (1998).
70. R. Rizzuto et al., *Oncogene* 22, 8619-8627 (2003).
71. A. P. Halestrap, G. P. McStay, S. J. Clarke, *Biochimie* 84, 153-166 (2002).
72. A. S. Belzacq, H. L. Vieira, G. Kroemer, C. Brenner, *Biochimie* 84, 167-176 (2002).
73. I. Marzo et al., *J.Exp.Med.* 187, 1261-1271 (1998).
74. D. R. Green and G. Kroemer, *Science* 305, 626-629 (2004).

75. Y. Ma and L. M. Hendershot, *Cell* 107, 827-830 (2001).
76. D. G. Breckenridge, M. Germain, J. P. Mathai, M. Nguyen, G. C. Shore, *Oncogene* 22, 8608-8618 (2003).
77. C. Reimertz, D. Kogel, A. Rami, T. Chittenden, J. H. Prehn, *J.Cell Biol.* 162, 587-597 (2003).
78. K. F. Ferri and G. Kroemer, *Nat.Cell Biol.* 3, E255-E263 (2001).
79. M. J. Berridge, P. Lipp, M. D. Bootman, *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 1, 11-21 (2000).
80. P. May and E. May, *Oncogene* 18, 7621-7636 (1999).
81. A. Tinel and J. Tschopp, *Science* 304, 843-846 (2004).
82. S. Leppa and D. Bohmann, *Oncogene* 18, 6158-6162 (1999).
83. K. Ono and J. Han, *Cell Signal.* 12, 1-13 (2000).
84. M. J. Marinissen and J. S. Gutkind, *Trends Pharmacol.Sci.* 22, 368-376 (2001).
85. S. J. Harper and P. LoGrasso, *Cell Signal.* 13, 299-310 (2001).
86. H. Kamata and H. Hirata, *Cell Signal.* 11, 1-14 (1999).
87. K. J. Davies, *IUBMB.Life* 50, 279-289 (2000).
88. C. Fleury, B. Mignotte, J. L. Vayssiere, *Biochimie* 84, 131-141 (2002).
89. M. D. Jacobson, *Trends Biochem.Sci.* 21, 83-86 (1996).
90. J. L. Martindale and N. J. Holbrook, *J.Cell Physiol* 192, 1-15 (2002).
91. G. Ermak and K. J. Davies, *Mol.Immunol.* 38, 713-721 (2002).
92. M. Crompton, *Biochem.J.* 341 (Pt 2), 233-249 (1999).
93. T. Kristian and B. K. Siesjo, *Stroke* 29, 705-718 (1998).
94. P. Lipton, *Physiol Rev.* 79, 1431-1568 (1999).
95. M. R. Duchon, *J.Physiol* 529 Pt 1, 57-68 (2000).
96. P. Nicotera, M. Leist, E. Ferrando-May, *Toxicol.Lett.* 102-103, 139-142 (1998).
97. E. Bonfoco, D. Krainc, M. Ankarcona, P. Nicotera, S. A. Lipton, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92, 7162-7166 (1995).
98. D. Vercammen et al., *J.Exp.Med.* 187, 1477-1485 (1998).
99. H. Matsumura et al., *J.Cell Biol.* 151, 1247-1256 (2000).
100. W. Fiers, R. Beyaert, W. Declercq, P. Vandenabeele, *Oncogene* 18, 7719-7730 (1999).
101. L. G. Costa, *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 38, 21-43 (1998).
102. J. T. Greenamyre, R. Betarbet, T. B. Sherer, *Parkinsonism Relat Disord.* 9 Suppl 2, S59-S64 (2003).
103. W. Dauer and S. Przedborski, *Neuron* 39, 889-909 (2003).
104. A. Almeida, J. Almeida, J. P. Bolanos, S. Moncada, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 15294-15299 (2001).
105. M. Leist and P. Nicotera, *Exp.Cell Res.* 239, 183-201 (1998).
106. L. Antkiewicz-Michaluk, *Pol.J.Pharmacol.* 54, 567-572 (2002).
107. T. Herraiz, *J.Chromatogr.A* 881, 483-499 (2000).
108. T. Uezono et al., *J.Neural Transm.* 108, 943-953 (2001).
109. K. Matsubara et al., *Brain Res.* 610, 90-96 (1993).
110. C. Braestrup, M. Nielsen, C. E. Olsen, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 77, 2288-2292 (1980).
111. C. Pena, J. H. Medina, M. L. Novas, A. C. Paladini, E. De Robertis, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 83, 4952-4956 (1986).
112. C. Pena, J. H. Medina, M. L. Novas, E. De Robertis, A. C. Paladini, *J.Chromatogr.* 431, 192-196 (1988).

113. D. A. Gearhart, E. J. Neafsey, M. A. Collins, *Neurochem.Int.* 40, 611-620 (2002).
114. K. Matsubara et al., *J.Neurochem.* 70, 727-735 (1998).
115. K. Matsubara et al., *Neurology* 45, 2240-2245 (1995).
116. M. Pawlik and H. Rommelspacher, *Eur.J.Pharmacol.* 147, 163-171 (1988).
117. B. Malgrange et al., *Neuroreport* 7, 3041-3045 (1996).
118. P. P. Lefebvre et al., *Brain Res.* 413, 120-128 (1987).
119. S. V. Kalivendi et al., *Biochem.J.* 371, 151-164 (2003).
120. T. Shang, A. V. Uihlein, J. Van Asten, B. Kalyanaraman, C. J. Hillard, *J.Neurochem.* 85, 358-367 (2003).
121. M. Bougria, J. Vitorica, J. Cano, A. Machado, *Eur.J.Pharmacol.* 291, 407-415 (1995).
122. V. J. Miralles et al., *Brain Res.* 922, 21-29 (2001).
123. S. Shimizu and Y. Tsujimoto, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 577-582 (2000).
124. S. Alavez, D. Pedroza, J. Moran, *Neurochem.Int.* 43, 581-590 (2003).
125. A. K. Bouzier-Sore, M. Merle, P. J. Magistretti, L. Pellerin, *J.Physiol Paris* 96, 273-282 (2002).
126. B. H. Juurlink and M. I. Sweeney, *Neurosci.Biobehav.Rev.* 21, 121-128 (1997).
127. K. Takuma, A. Baba, T. Matsuda, *Prog.Neurobiol.* 72, 111-127 (2004).
128. H. W. Muller, U. Junghans, J. Kappler, *Pharmacol.Ther.* 65, 1-18 (1995).
129. C. M. Anderson and R. A. Swanson, *Glia* 32, 1-14 (2000).
130. S. J. Heales et al., *Biochim.Biophys.Acta* 1410, 215-228 (1999).
131. Y. Nishizawa, *Life Sci.* 69, 369-381 (2001).
132. J. M. Rigo et al., *Biochem.Pharmacol.* 52, 465-473 (1996).
133. R. J. Walters, S. H. Hadley, K. D. Morris, J. Amin, *Nat.Neurosci.* 3, 1274-1281 (2000).
134. M. Naoi, W. Maruyama, G. M. Nagy, *Neurotoxicology* 25, 193-204 (2004).
135. K. Matsubara, K. Aoyama, M. Suno, T. Awaya, *Neurotoxicol.Teratol.* 24, 593-598 (2002).
136. K. E. Krueger, *Biochim.Biophys.Acta* 1241, 453-470 (1995).
137. M. J. Woods and D. C. Williams, *Biochem.Pharmacol.* 52, 1805-1814 (1996).
138. J. J. Lacapere et al., *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 284, 536-541 (2001).
139. E. Joseph-Liauzun, P. Delmas, D. Shire, P. Ferrara, *J.Biol.Chem.* 273, 2146-2152 (1998).
140. R. R. Anholt, P. L. Pedersen, E. B. De Souza, S. H. Snyder, *J.Biol.Chem.* 261, 576-583 (1986).
141. M. W. McEnery, A. M. Snowman, R. R. Trifiletti, S. H. Snyder, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89, 3170-3174 (1992).
142. M. W. McEnery, *J.Bioenerg.Biomembr.* 24, 63-69 (1992).
143. E. Joseph-Liauzun, R. Farges, P. Delmas, P. Ferrara, G. Loison, *J.Biol.Chem.* 272, 28102-28106 (1997).
144. A. Beurdeley-Thomas, L. Miccoli, S. Oudard, B. Dutrillaux, M. F. Poupon, *J.Neurooncol.* 46, 45-56 (2000).
145. A. P. Sutter et al., *Int.J.Cancer* 102, 318-327 (2002).
146. A. P. Sutter, K. Maaser, B. Barthel, H. Scherubl, *Br.J.Cancer* 89, 564-572 (2003).

147. A. P. Sutter et al., *Biochem.Pharmacol.* 67, 1701-1710 (2004).
148. D. Decaudin et al., *Cancer Res.* 62, 1388-1393 (2002).
149. T. Hirsch et al., *Exp.Cell Res.* 241, 426-434 (1998).
150. F. Bono, I. Lamarche, V. Prabonnaud, G. Le Fur, J. M. Herbert, *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 265, 457-461 (1999).
151. R. Strohmeier, M. Roller, N. Sanger, R. Knecht, H. Kuhl, *Biochem.Pharmacol.* 64, 99-107 (2002).
152. D. M. Zisterer, G. Campiani, V. Nacci, D. C. Williams, *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 293, 48-59 (2000).
153. R. Fischer, M. Schmitt, J. G. Bode, D. Haussinger, *Gastroenterology* 120, 1212-1226 (2001).
154. D. A. Fennell, M. Corbo, A. Pallaska, F. E. Cotter, *Br.J.Cancer* 84, 1397-1404 (2001).
155. A. Berson et al., *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 299, 793-800 (2001).
156. P. E. Stoebner et al., *Cell Death.Differ.* 8, 747-753 (2001).
157. M. Gavish et al., *Pharmacol.Rev.* 51, 629-650 (1999).
158. V. Papadopoulos et al., *J.Biol.Chem.* 272, 32129-32135 (1997).
159. E. Kelly-HersHKovitz et al., *J.Biol.Chem.* 273, 5478-5483 (1998).
160. J. D. Hirsch, C. F. Beyer, L. Malkowitz, B. Beer, A. J. Blume, *Mol.Pharmacol.* 35, 157-163 (1989).
161. P. Casellas, S. Galiegue, A. S. Basile, *Neurochem.Int.* 40, 475-486 (2002).
162. T. J. Donohue, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94, 4821-4822 (1997).
163. D. Kletsas, W. Li, Z. Han, V. Papadopoulos, *Biochem.Pharmacol.* 67, 1927-1932 (2004).
164. A. Beinlich, R. Strohmeier, M. Kaufmann, H. Kuhl, *Biochem.Pharmacol.* 60, 397-402 (2000).
165. K. Maaser et al., *Clin.Cancer Res.* 8, 3205-3209 (2002).
166. M. Hardwick et al., *Cancer Res.* 59, 831-842 (1999).
167. M. Hardwick, J. Rone, Z. Han, B. Haddad, V. Papadopoulos, *Int.J.Cancer* 94, 322-327 (2001).
168. H. Miettinen et al., *Cancer Res.* 55, 2691-2695 (1995).
169. V. Papadopoulos et al., *Anticancer Res.* 20, 2835-2847 (2000).
170. S. Galiegue, N. Tinel, P. Casellas, *Curr.Med.Chem.* 10, 1563-1572 (2003).
171. E. Romeo et al., *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 262, 971-978 (1992).
172. S. Okuyama et al., *Life Sci.* 64, 1455-1464 (1999).
173. B. Ferzaz et al., *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 301, 1067-1078 (2002).
174. S. Selleri et al., *Bioorg.Med.Chem.* 9, 2661-2671 (2001).
175. S. Galiegue et al., *J.Biol.Chem.* 274, 2938-2952 (1999).
176. J. E. Ricci, R. A. Gottlieb, D. R. Green, *J.Cell Biol.* 160, 65-75 (2003).
177. J. P. Vrabec, C. J. Lieven, L. A. Levin, *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 44, 2774-2782 (2003).
178. L. He and J. J. Lemasters, *FEBS Lett.* 512, 1-7 (2002).
179. B. Pettmann and C. E. Henderson, *Neuron* 20, 633-647 (1998).
180. V. Narayanan, *Pediatr.Neurol.* 16, 9-13 (1997).
181. A. Rocchi, S. Pellegrini, G. Siciliano, L. Murri, *Brain Res.Bull.* 61, 1-24 (2003).

182. M. E. Ripps, G. W. Huntley, P. R. Hof, J. H. Morrison, J. W. Gordon, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92, 689-693 (1995).
183. M. G. Murer, Q. Yan, R. Raisman-Vozari, *Prog.Neurobiol.* 63, 71-124 (2001).
184. S. D. Skaper and F. S. Walsh, *Mol.Cell Neurosci.* 12, 179-193 (1998).
185. M. A. Collins and E. J. Neafsey, *Neurotoxicol.Teratol.* 24, 571-577 (2002).