



**HAL**  
open science

# Alix, un lien entre le système endolysosomal et la mort cellulaire.

Anne-Laure Mahul-Mellier

► **To cite this version:**

Anne-Laure Mahul-Mellier. Alix, un lien entre le système endolysosomal et la mort cellulaire.. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT : . tel-00339760

**HAL Id: tel-00339760**

**<https://theses.hal.science/tel-00339760>**

Submitted on 18 Nov 2008

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

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



**THESE**  
pour l'obtention du grade de  
**Docteur de l'Université Joseph Fourier I**  
Discipline : Neurobiologie

Présentée et soutenue publiquement par : **Anne-Laure Mahul-Mellier**

**Le 6 juillet 2007**

**Alix**  
**un lien entre la voie endolysosomale**  
**et la mort cellulaire**

**Co-directeurs de thèse : Dr Sandrine Fraboulet**  
**Pr. Rémy Sadoul**

**Membres du Jury :**  
**Pr Stefan Nonchev (président du jury)**  
**Dr Patrick Mehlen (rapporteur)**  
**Dr Olivier Micheau (rapporteur)**  
**Dr Georg Haase (examineur)**  
**Dr Laurence Aubry (examineur)**  
**Dr Sandrine Fraboulet**  
**Pr. Rémy Sadoul**

Thèse préparée au sein du laboratoire Neurodégénérescence et Plasticité U836, Grenoble

**EDCSV- Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant-Grenoble**

# Introduction

## Chapitre 1. La mort cellulaire programmée : les différents acteurs et mécanismes moléculaires

<b>I. Caractérisation morphologiques des différents processus de mort cellulaire</b>	1
<b>II. De <i>C.elegans</i> aux mammifères</b>	3
<b>III. Les caspases</b>	
III.1 Nomenclature, classification et structure des caspases	4
III.2 Mode d'activation et substrats spécifiques des caspases	5
a) Activation des caspases	5
b) Les substrats des caspases	8
<b>IV. Les voies moléculaires impliquées dans l'activation des caspases</b>	10
IV.1 La voie extrinsèque des récepteurs de morts	10
a) La superfamille des TNF récepteurs	10
b) Les mécanismes moléculaires d'activation de Fas/FasL	12
c) Les voies de signalisation des TNF récepteurs	13
• Le TNFR1	13
<i>La trimérisation du récepteur</i>	13
<i>La voie NFκB</i>	16
<i>La voie de mort du TNFR1</i>	17
<i>Rôle des JNK dans la voie du TNFR1</i>	18
<i>Rôle des sphingomyelinases et des céramides dans la voie du TNFR1</i>	19
• Le TNFR2	20
d) p75 <sup>NGFR</sup> et la mort neuronale	21
IV.2 La voie intrinsèque mitochondriale	19
a) Les acteurs de la voie mitochondriale	21
b) La famille Bcl-2 : les régulateurs de la voie mitochondriale	22
<b>V. Régulation des signaux apoptotiques</b>	23
V.1 Flip : le régulateur de la voie des récepteurs de morts	23
V.2 Les IAPs	24
V.3 p35 et CrmA	25
V.4 Smac/DIABLO	25
V.5 La régulation par compartimentation sub-cellulaire des caspases	26
<b>VI. Un dialogue possible entre les voies extrinsèques et intrinsèques de mort</b>	26
<b>VII. La mort « caspase-indépendante »</b>	27

## **Chapitre 2. La mort cellulaire programmée des motoneurones au cours du développement embryonnaire**

<b>I. Les motoneurones : origine, localisation et rôle au cours du développement embryonnaire</b>	31
I.1 Les premières étapes du développement embryonnaire du système nerveux	31
I.2 Localisation et acquisition de l'identité propre de chaque pool de motoneurones	32
a) Localisation des neurones dans la moelle épinière	32
b) La naissance et la différenciation des motoneurones	33
<b>II. Caractérisation de la mort naturelle des motoneurones</b>	36
II.1 Mise en évidence spatiotemporelle de la mort physiologique des motoneurones	36
II.2 La survie des motoneurones dépend d'une compétition pour les facteurs extrinsèques : les neurotrophines	38
II.3 Hypothèse d'une horloge intrinsèque	41
II.4 Rôle des caspases dans la mort programmée des motoneurones	41
a) Les exécutants impliqués dans la mort tardive des motoneurones	43
b) Les exécutants impliqués dans la mort précoce des motoneurones	43
c) Les voies alternatives « caspases indépendantes »	44
<b>III. Les récepteurs de mort dans la mort des neurones et des motoneurones</b>	45
III.1 Fas/CD95 et la mort neuronale	45
III.2 Le TNFR1 et la mort neuronale	46
III.3 Le récepteur à la neurotrophine P75 <sup>NGFR</sup> et la mort neuronale	47
<b>IV. La voie endolysosomale et la mort neuronale</b>	48

## **Chapitre 3. Alix, un lien entre la mort cellulaire et la voie endolysosomale**

<b>I. Alix et la voie endolysosomale</b>	49
I.1 La formation des corps multivésiculés de la voie endolysosomale	49
a) La voie endolysosomale	50
b) Les ESCRTs	51
I.2 Alix et la formation des corps multivésiculés	51
a) Alix et les ESCRTs	52
b) Alix et le LBPA	52
I.3 Alix et ses partenaires de la voie endocyttaire	53
a) Alix et les endophilines	53
c) Alix et CIN85	54
I.4 Alix et le bourgeonnement des virus	56
I.5 Alix : de <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> aux mammifères	57
<b>II. Alix, ALG-2 et la mort cellulaire</b>	58

## **Résultats et Discussions**

<b>A. Article 1 :</b>	61
L'expression d'Alix au cours du développement embryonnaire du poulet	
<b>B. Article 2 :</b>	63
Alix, un lien entre ALG-2, les ESCRTs et la mort naturelle des motoneurones au cours du développement embryonnaire chez le poulet	
<b>C. Article 3 :</b>	68
Alix/ALG-2 dans la voie de mort du TNFR1	

## **Bibliographie**

## Liste des principales abréviations

AIF	: Apoptosis <b>I</b> nducing <b>F</b> actor
ALG-2	: Apoptosis <b>L</b> ink <b>G</b> ene- <b>2</b>
Alix	: <b>ALG-2</b> Interaction protein <b>X</b>
Apaf-1	: Apoptotic <b>p</b> rotease <b>a</b> ctivating <b>f</b> actor-1
Cbl	: <b>C</b> asitas <b>b</b> lineage <b>L</b> ymphoma
CIN85	: <b>Cbl-Interacting</b> protein of <b>85</b> kDa
CHMP	: <b>C</b> harged <b>M</b> ultivesicular <b>B</b> ody Protein
CMV	: <b>C</b> orps <b>M</b> ultivésiculés
DD	: <b>D</b> eath <b>D</b> omain
DED	: <b>D</b> eath <b>E</b> ffector <b>D</b> omain
DISC	: <b>D</b> eath <b>I</b> nducing <b>S</b> ignalling <b>C</b> omplex
ESCRT	: <b>E</b> ndosomal <b>S</b> orting <b>C</b> omplex <b>R</b> equired for <b>T</b> ransport
FADD	: <b>F</b> as <b>A</b> ssociated protein with <b>D</b> eath <b>D</b> omain
FLIP	: <b>FLICE</b> <b>I</b> nhibitory <b>P</b> rotein
FLICE	: <b>F</b> ADD-like <b>IL-1<math>\beta</math></b> -converting <b>e</b> nzyme
IAP	: <b>I</b> nhibitor of <b>A</b> poptosis
JNK	: c- <b>J</b> un <b>NH2-terminal</b> <b>K</b> inase
LBPA	: <b>L</b> yso <b>B</b> is <b>P</b> hosphatidic <b>A</b> cid
MVB	: <b>M</b> ultivesicular <b>B</b> ody
NF $\kappa$ B	: <b>N</b> uclear <b>F</b> actor <i><b>K</b>appa <b>B</b></i>
PRD	: <b>P</b> roline <b>R</b> ich <b>D</b> omain
RIP	: <b>R</b> eceptor <b>I</b> nteracting <b>P</b> rotein
SNF7	: <b>S</b> ucrose <b>N</b> on <b>F</b> ermenting <b>7</b>
TGN	: <b>T</b> rans <b>G</b> olgi <b>N</b> etwok
TNF $\alpha$	: <b>T</b> umor <b>N</b> ecrosis <b>F</b> actor <b>a</b> lpha
TNFR	: <b>T</b> umor <b>N</b> ecrosis <b>F</b> actor <b>R</b> eceptor
TRADD	: <b>TNFR</b> <b>A</b> ssociated <b>D</b> eath <b>D</b> omain
TRAF	: <b>TNF</b> <b>R</b> eceptor <b>A</b> ssociated <b>F</b> actor
Vps	: <b>V</b> acuolar <b>P</b> rotein <b>S</b> orting

# **Introduction**

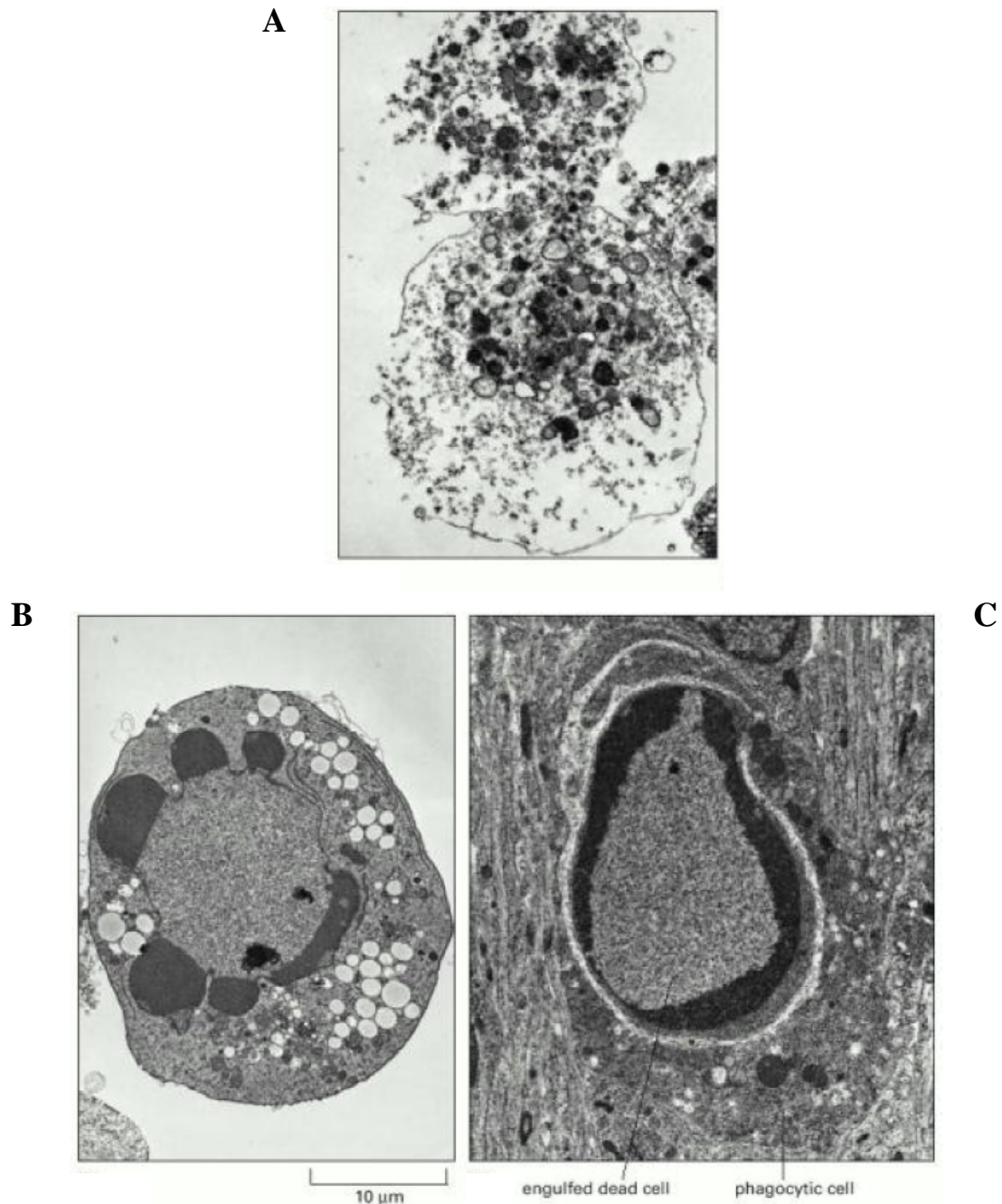
## **Chapitre 1. La mort cellulaire programmée : les différents acteurs et mécanismes moléculaires**

La mort cellulaire programmée est un processus physiologique au cours duquel des mécanismes complexes sont activés pour aboutir à la destruction de la cellule. Ce « suicide cellulaire » est un événement clé en biologie car il permet l'équilibre entre prolifération et dégénérescence cellulaire dans les organismes pluricellulaires adultes. La mort cellulaire programmée survient physiologiquement au cours de l'embryogenèse, du renouvellement tissulaire et lors du vieillissement. Au cours du développement embryonnaire du système nerveux chez les vertébrés par exemple, plus de la moitié des cellules nerveuses meurent naturellement après avoir été formées. Chez l'homme, la mort programmée de  $5 \times 10^{11}$  cellules sanguines, chaque jour, est nécessaire pour équilibrer leur production continue dans la moelle osseuse. Chez l'adulte, une augmentation de l'apoptose neuronale a été observée dans un certain nombre de maladies neurodégénératives, telles que la sclérose latérale amyotrophique, la maladie d'Alzheimer ou lors des accidents vasculaires cérébraux ischémiques.

### **I. Caractéristiques morphologiques des différents processus de mort cellulaire**

Dans les années 1970, J.F Kerr et A.H Wyllie (Kerr et al., 1972) ont décrit la mort cellulaire programmée sous le nom d' « apoptose » (le nom apoptose fait référence à la chute programmée des feuilles à l'automne; *apo* pour éloignement et *ptose* pour chute). Ces auteurs ont décrit deux modes distincts de mort cellulaire sur la base de critères morphologiques. Le premier type de mort cellulaire, dénommé nécrose, est caractérisé par la perte précoce de l'intégrité membranaire et mitochondriale, une augmentation rapide du volume cellulaire et le relargage du contenu lysosomal provoquant une lésion et une réaction inflammatoire au niveau du tissu environnant. Au cours de la mort nécrotique, le noyau reste intact (**Figure 1**). Au contraire, l'apoptose se caractérise par le maintien de l'intégrité membranaire, une condensation cytoplasmique, une diminution du volume cellulaire et une destruction du noyau. La structure des organelles est préservée alors que la chromatine se condense et se fragmente en périphérie du noyau. L'ADN est fragmenté en séquences multiples de 150 à 200 paires de bases. Ces 200 paires de bases correspondent à la longueur de l'ADN enroulé autour des octamères d'histones dans un nucléosome. Cette fragmentation régulière qui peut être visualisée par migration de l'ADN génomique d'une cellule apoptotique sur gel d'électrophorèse montre un aspect typique "en échelle". Au cours de l'apoptose, la cellule se fragmente progressivement en corps apoptotiques mais préserve son contenu lysosomal. *In*





**Figure 1 : Electronographies de cellules en train de mourir par nécrose (A) ou par apoptose (B et C) prises au microscope électronique à transmission.**

A. La nécrose est caractérisé par une augmentation rapide du volume cellulaire, la perte précoce de l'intégrité membranaire et mitochondriale ainsi qu'un relargage du contenu lysosomal provoquant une lésion et une réaction inflammatoire au niveau du tissu environnant

B. L'apoptose se caractérise par le maintien de l'intégrité membranaire et une diminution du volume cellulaire. La structure des organelles est préservée alors que la chromatine se condense et se fragmente. La cellule se fragmente également en corps apoptotiques mais préserve son contenu lysosomal. Les vacuoles visibles dans le cytoplasme sont des caractéristiques variables de l'apoptose.

C. Dans un tissu en développement, les corps apoptotiques sont alors phagocytés par des cellules voisines.

*vivo*, ces corps apoptotiques sont alors phagocytés. L'apoptose est un mécanisme programmé et « silencieux » pour l'organisme l'apoptose ne déclenche pas, *in vivo*, de réaction inflammatoire (**Figure 1**). Il permet donc la régulation des populations cellulaires tout en respectant l'intégrité de l'organisme. Le processus apoptotique s'oppose par conséquent au phénomène de nécrose définie comme une mort accidentelle et incontrôlée causée par des perturbations environnementales violentes (hypoxie, traumatisme, variation de l'osmolarité, du pH ou de la température) conduisant à l'éclatement immédiat de la cellule. Un défaut d'apoptose peut entraîner des syndromes prolifératifs associés à un processus de tumorigénèse, tout particulièrement au niveau des tissus à renouvellement rapide comme le système immunitaire (lymphome, leucémie). A l'inverse, une activation anormale de l'apoptose peut donner lieu à des phénomènes de dégénérescences, comme cela est observé au cours de nombreuses maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, ou la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA).

À côté de ces deux types de mort cellulaire, on distingue la mort autophagique principalement observée chez le protiste *dictyostelium discoideum* (Cornillon et al., 1994) et le nématode *c.elegans* (Hall et al., 1997). L'autophagie est caractérisée par la présence dans les cellules de nombreuses vacuoles autophagiques à double ou à multiple membranes contenant des fragments de cytoplasme et des organelles. Ces vacuoles autophagiques et leur contenu sont détruits par le système endolysosomal de la cellule. Certaines caractéristiques apoptotiques comme la condensation nucléaire et le bourgeonnement de la membrane plasmique peuvent avoir lieu tardivement dans la mort autophagique mais ne sont pas prédominantes (Baehrecke et al., 2005). La biologie du développement a fourni de nombreuses preuves morphologiques, histologiques et biochimiques de l'existence de la mort autophagique *in vivo* à la fois au cours de la métamorphose de l'insecte mais aussi au cours de la morphogénèse des organes chez les vertébrés (pour revue voir Clarke et al., 1990). La mort autophagique est associée chez l'homme à certaines maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (Cataldo et al., 1995), de Parkinson (Anglade et al., 1997) et de Huntington (Petersen et al., 2001).

Il existe donc une grande diversité des voies de mort cellulaire. Ainsi, se basant sur les différences dans les caractéristiques morphologiques ultrastructurales, Schweichel et Merker ont proposé une classification distinguant trois types de mort cellulaire. Selon cette classification, il existe deux formes principales de mort cellulaire programmée : la mort de type I correspondant aux cellules présentant une morphologie apoptotique dont les débris sont

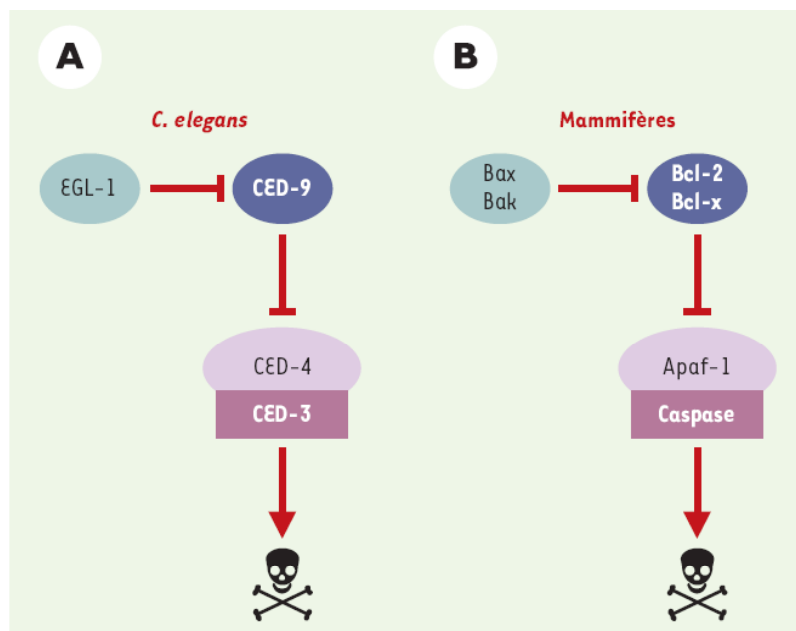
éliminés par les lysosomes des cellules phagocytaires et la mort de type II correspondant à la mort autophagique caractérisée par une intense activité autophagique et lysosomale. La mort de type III englobe tous les autres types de mort dits non-lysosomals présentant une importante vacuolisation cytoplasmique d'origine mal connue (Schweichel and Merker, 1973).

## **II. De *C.elegans* aux mammifères**

Les travaux de Horvitz sur la mort cellulaires, dans le nématode *Cænorhabditis elegans*, ont permis de découvrir toute une série de gènes jouant un rôle clé dans la régulation et le déclenchement de l'apoptose. Au cours du développement normal de ce vers, 131 cellules sur un total de 1090 sont éliminées par un processus de mort cellulaire programmée. Parmi les gènes impliqués dans la régulation de ce phénomène, *ced-3* et *ced-4* (*ced* pour *Cænorhabditis elegans death*) sont requis dans le déclenchement de l'apoptose. Si l'un des deux gènes est inactivé, la mort naturelle cellulaire programmée n'a pas lieu. Le gène *ced-9*, fonctionne lui comme un régulateur négatif de l'apoptose. La mutation de *ced-9* provoque la mort de cellules qui auraient dû survivre alors que sa surexpression est suffisante pour protéger les cellules de la mort. La mort cellulaire est déclenchée quand la protéine Egl-1 se lie à la protéine CED-9 pour en réguler négativement l'activité (Horvitz, 1999). La protéine CED-4 est alors libre de s'oligomériser avec la protéine CED-3 provoquant son auto-activation. Les homologues de ces gènes ont été identifiés chez les mammifères :

- *ced-3* code pour une protéase à cystéine dont le premier homologue commun a été l'enzyme de conversion de l'IL-1b (ICE désignée aujourd'hui comme caspase 1) (Yuan et al., 1993).
- *ced-4* code pour une protéine ayant des homologies avec la protéine humaine Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) (Zou et al., 1997).
- *ced-9* code pour une protéine homologue à la protéine anti-apoptotique Bcl-2 préalablement identifiée chez l'Homme (White, 1996).

Si le schéma général de l'activation de l'apoptose est conservé entre les nématodes et les mammifères (**Figure 2**), la multiplicité des gènes impliqués dans l'apoptose chez les mammifères augmente le niveau de complexité des mécanismes de régulation de la mort cellulaire programmée chez les organismes supérieurs.



**Figure 2 : Les protéines essentielles au programme de mort cellulaire chez *C.elegans* et chez les mammifères (Couzinet et al, 2002).**

Les études génétiques chez *C.elegans* ont permis de découvrir 4 protéines clé indispensables au déroulement de la mort cellulaire programmée. Des homologues de chacune de ces protéines ont été identifiés chez les mammifères.

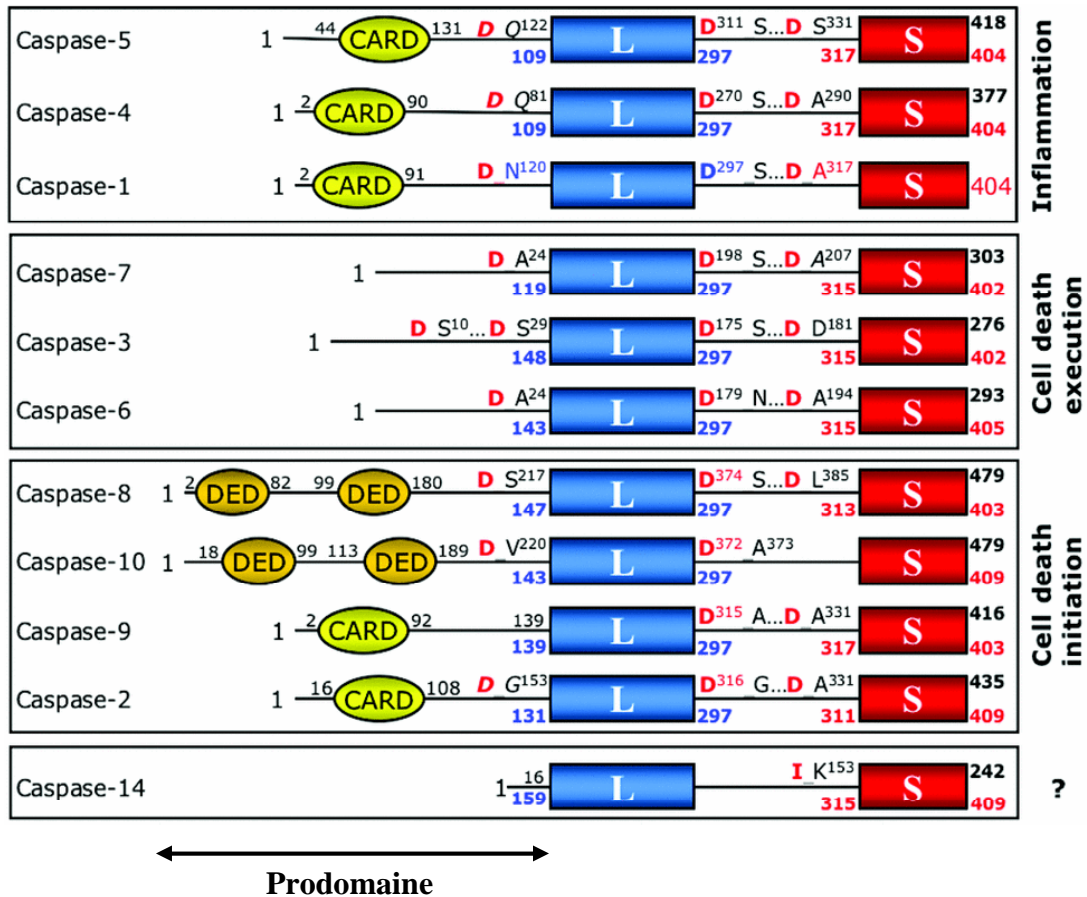
### III. Les Caspases

#### III.1 Nomenclature, classification et structure des caspases

Les travaux pionniers dans l'identification des gènes impliqués dans le programme de mort cellulaire lors du développement de *C.elegans* ont permis de découvrir que la protéine CED-3, avait une homologie significative avec la protéase ICE des mammifères (interleukine-1 converting enzyme) (Thornberry et al., 1992; Yuan et al., 1993). ICE fait partie d'une famille de protéases regroupée plus tard sous le nom de caspase (cysteinyll aspartate-specific proteinases). ICE sera ainsi rebaptisée caspase 1. A ce jour 14 caspases ont été identifiées chez l'homme (Alnemri et al., 1996) (Nicholson, 1999) (**Figure 3**).

Toutes les caspases ont une structure comprenant : un pro-domaine N-terminal très variable et un domaine qui donnera après clivage la grande sous-unité « p20 » (17-21 kDa) portant le centre actif et conservé chez toutes les caspases et la petite sous-unité « p10 » (10-14 kDa) (**Figure 4**). Les pro-domaines sont variables, à la fois dans leur taille et dans leur séquence. Ainsi les caspases 3, 6, 7 et 14 ont un petit pro-domaine alors que les caspases 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12 et 13 possèdent un grand pro-domaine.

- Ⓢ Les longs pro-domaines qui caractérisent les caspases d'amont ou initiatrices semblent jouer un rôle dans les interactions protéines-protéines. Ainsi les pro-domaines des caspases 8 et 10 contiennent des domaines effecteurs de la mort cellulaire (DED : Death Effector Domain) qui sont des séquences permettant la liaison des caspases aux molécules adaptatrices FADD (Fas protein associated with Death Domain) (Boldin et al., 1996) (Chinnaiyan et al., 1995) ou TRADD (TNFR associated DD) (Hsu et al., 1995) (voir chapitre 1. IV.1). Certaines autres caspases (caspases 1, 2, 4 et 9) possèdent un domaine de recrutement des caspases (CARD : Caspase Recruitment Domain) (Hofmann et al., 1997). Ces domaines CARDS jouent un rôle dans l'interaction des caspases entre elles ou dans l'interaction des caspases avec une grande variété de molécules régulatrices comme Apaf-1 (Zhou et al. 1999) ou RAIDD (RIP associated ICH-1/CED-3 homologous protein with a DD) (pour revue Bouchier-Hayes et al., 2002). Le recrutement des pro-caspases initiatrices par les protéines adaptatrices entraîne l'oligomérisation des pro-enzymes et leur activation par autocatalyse (Kumar and Colussi, 1999).



**Figure 3 : Classification des caspases humaines selon leurs homologies de séquence (Fuentes-Prior et al, 2004).**

Les caspases peuvent être regroupées selon leurs homologies de séquences en trois familles correspondant à leur rôle physiologique dans le processus inflammatoire, l'initiation de la voie de mort ou l'exécution de cette voie de mort.

CARD : « Caspase Recruitment Domain », DED : « Death Effector Domaine », L: grande sous-unité, S : petite sous-unité.

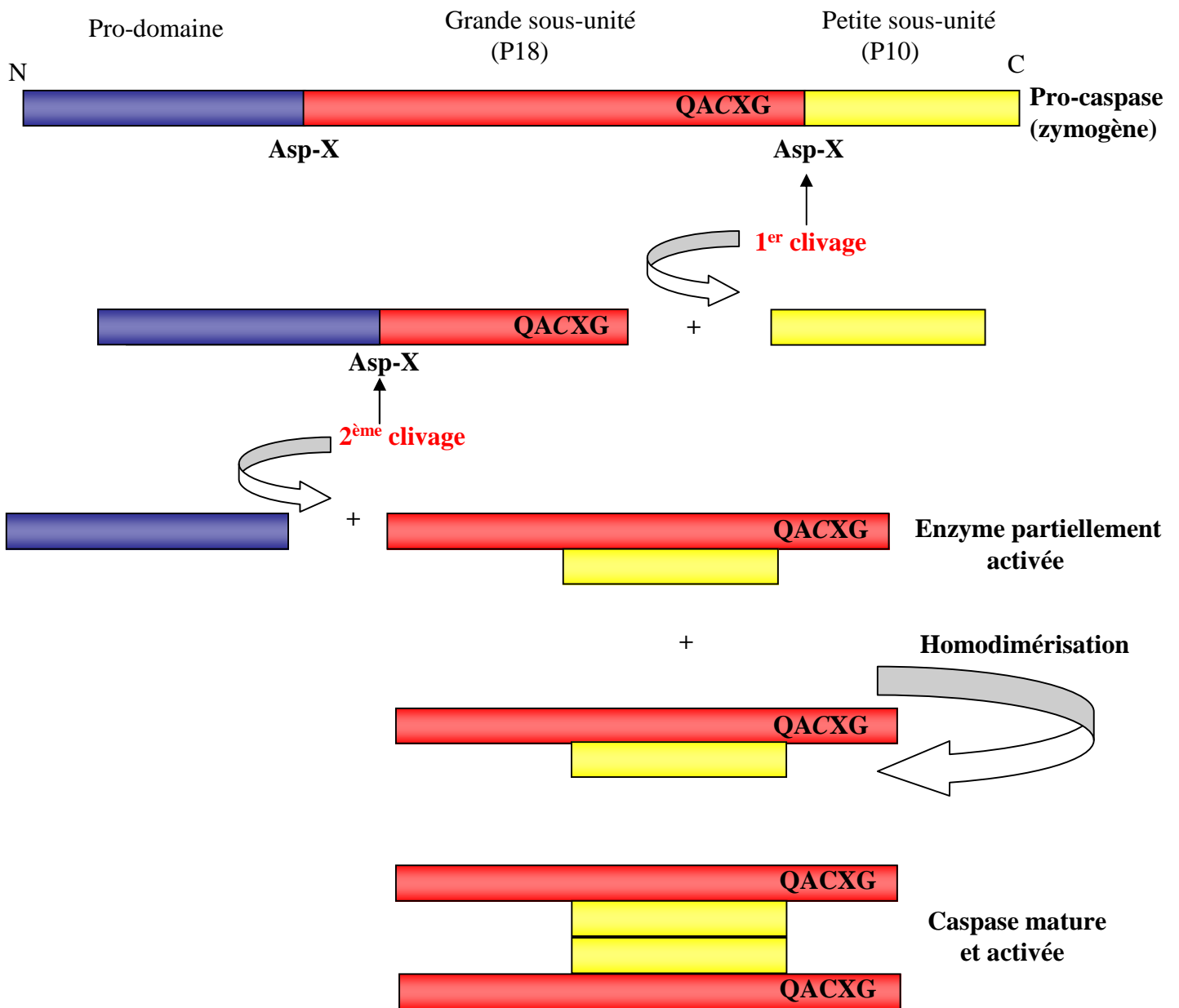
- Ⓢ Les caspases à petits pro-domaines sont souvent regroupées sous le nom de caspases effectrices. Elles ne possèdent pas de domaine de recrutement et d'oligomérisation. Ces caspases sont activées par les caspases dites initiatrices ou par d'autres protéases tels que le granzyme B ou les calpaïnes. Leur activation, conduit au clivage de diverses protéines substrats (Thornberry, 1998) à l'origine de la plupart des événements biochimiques, structuraux ou morphologiques de l'apoptose.

### **III. 2 Mode d'activation et substrats spécifiques des caspases**

#### **a) L'activation des caspases**

L'ensemble des membres de cette famille d'endoprotéases possède un site catalytique comprenant un résidu cystéine directement impliqué dans le processus catalytique localisé dans un motif QACxG (où le résidu x est R, Q ou G). Ces enzymes reconnaissent, puis clivent des chaînes polypeptidiques après un aspartate (Budihardjo et al., 1999). Le site catalytique de la caspase non activée à l'état de pro-caspase est masqué. La conversion de la caspase à l'état de zymogène en une enzyme mature nécessite au moins deux clivages après un aspartate (**Figure 4**). Ces clivages successifs ont lieu de manière séquentielle. Une première coupure a lieu entre la grande et la petite sous-unité libérant ainsi la petite sous-unité du reste de la molécule. Un deuxième clivage permet la libération du pro-domaine. La caspase va alors pouvoir s'assembler sous sa forme active, composée de deux grandes et de deux petites sous-unités. La structure générale ainsi obtenue est  $(p10/p20)_2$  (Walker et al., 1994) (Wilson et al., 1994) (Rotonda et al., 1996) (**Figure 4**). Les caspases peuvent s'auto-activer et/ou être activées par d'autres caspases introduisant la notion de cascade d'activation. Ainsi, une fois les caspases initiatrices activées, elles vont pouvoir cliver d'autres caspases encore à l'état de zymogène (notamment les caspases effectrices). Ce type d'activation en cascade permet la régulation et l'amplification du signal.

Trois mécanismes généraux d'activation par clivage des caspases ont été décrits : le clivage par une caspase active, l'auto-activation par proximité induite et l'association avec un régulateur.



**Figure 4 : Activation des caspases.**

Les pro-caspases sont formées d'un pro-domaine N-terminal de taille variable, suivi de la séquence de la grande sous-unité portant le site catalytique QACXG puis de la séquence codant pour la petite sous-unité en C-terminal. La première coupure enzymatique permet la libération de la petite sous-unité du reste de la protéine. Le deuxième clivage sépare le prodomaine de la grande sous-unité. L'association de deux hétérodimères, chacun formé de l'association des deux sous-unités contenant le site actif, forme la caspase activée.



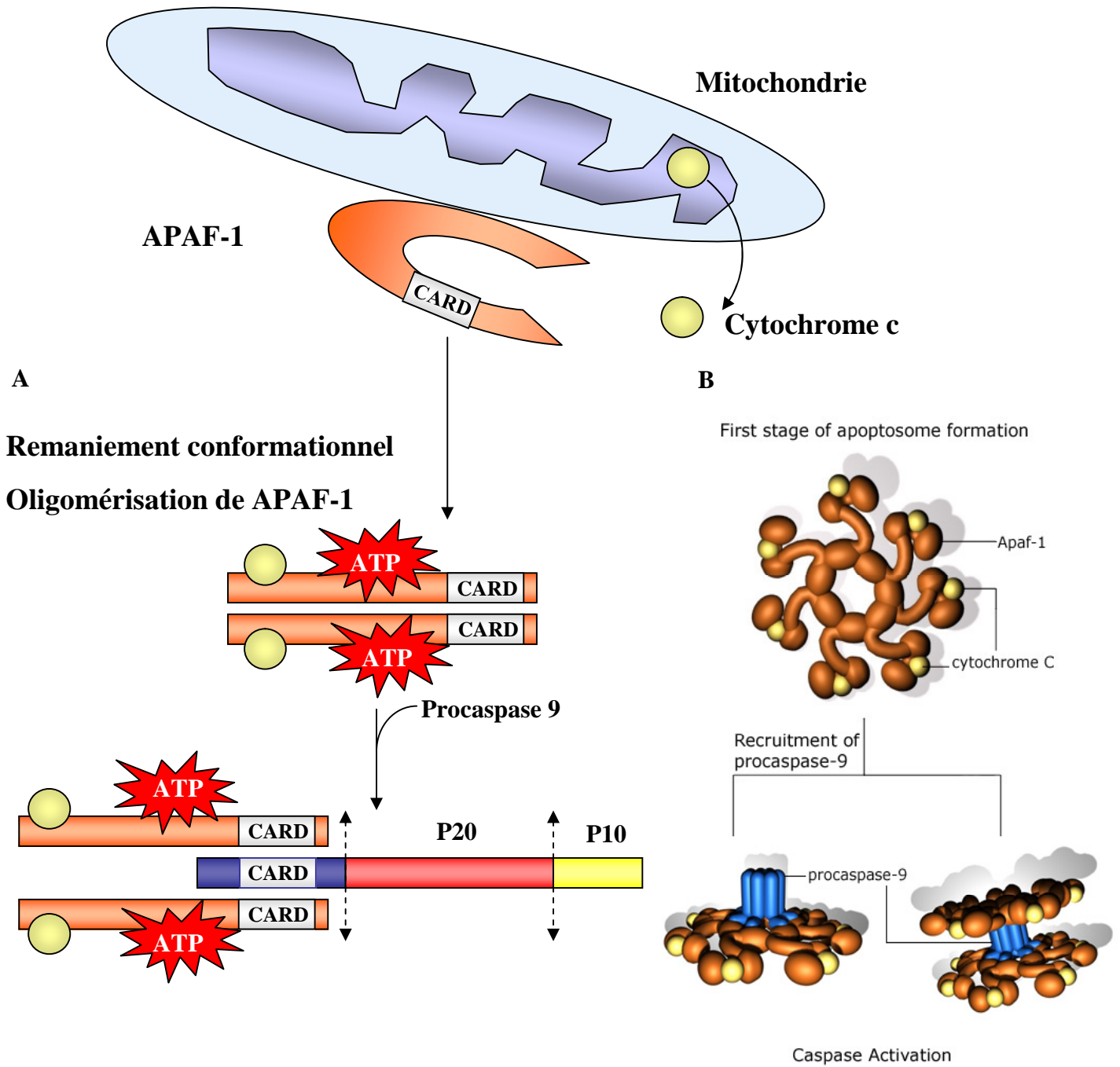
### ⊗ Le clivage en cascade

Les caspases 3, 6 et 7, regroupées sous le nom de caspases effectrices ne peuvent pas être activées par un mécanisme d'auto-activation. En effet, ces protéases disposent d'un pro-domaine court incapable d'initier leur oligomérisation et leur activation. Les sites (Asp-X) de clivage des pro-caspases correspondent à des séquences reconnues par des caspases. Ainsi, un moyen simple et efficace d'activer une pro-caspase est de l'exposer à une caspase active. Des études menées sur des extraits cellulaires ont démontré que les caspases initiatrices étaient capables d'activer efficacement les caspases effectrices (Srinivasula et al., 1996) (Muzio et al., 1997). Dans ces systèmes, l'activation protéolytique des caspases 3 et 7 par l'action directe des caspases 8 et 10 a été mise en évidence (Nagata, 1997) (Stennicke et al., 1998) (Yang et al., 1998). De même, la caspase 9 est capable d'induire l'activation des pro-caspases 3 et 7 (Li et al., 1997) (Srinivasula et al., 1998). Cette cascade permet la régulation et l'amplification du signal apoptotique. Par exemple, une fois activée par les caspases initiatrices 8 ou 9, la caspase 3 peut activer la pro-caspase 2 et la pro-caspase 6 (Adrain and Martin, 2001). Ainsi les caspases 8, 9 et 10 sont décrites comme les protéases gouvernant l'activation séquentielle des caspases effectrices dans l'apoptose. Des études *in vitro* démontrent que les caspases effectrices peuvent également cliver des caspases initiatrices. La caspase 3, par exemple, est capable de cliver la pro-caspase 8 (Stennicke et al., 1998) et les pro-caspases 2 et 9 (Slee et al., 1999). La caspase 6 est également capable de cliver les pro-caspases initiatrices 8 et 10 (Slee et al., 1999). Ces travaux suggèrent une boucle d'amplification *in vivo*. Cependant, ce mécanisme n'explique pas comment la première caspase de la cascade pourrait être activée. Les deux autres modes d'activation étudiés proposent des réponses à cette question.

### ⊗ Modèle d'activation par proximité

L'activation des caspases initiatrices 2, 8 et 10 résulte de la stimulation des récepteurs de mort (voir chapitre 1. IV.1). En réponse à un ligand, ces récepteurs se trimérisent et recrutent des protéines adaptatrices via leur domaine de mort « DD » (death domain). Ces protéines adaptatrices vont alors pouvoir recruter les pro-caspases initiatrices à l'état de zymogène permettant leur oligomérisation. Il en résulte une concentration locale élevée en pro-enzymes permettant la protéolyse intra- et inter-moléculaire et leur activation.

La pro-caspase 8 (Kischkel et al., 1995) et la pro-caspase 10 (Kischkel et al., 2001) oligomérisent via la protéine adaptatrice FADD par leur domaine effecteur de mort (DED).



**Figure 5 : La formation de l'apoptosome et l'activation de la caspase 9.**

A. Voie séquentielle d'activation de la Caspase 9.

B. Formation de l'apoptosome en 3D : 7 molécules d'APAF-1, de cytochrome c et d'ATP s'associent pour former un complexe. Cette structure heptamérique recrute et active 7 molécules de pro-caspase 9.

FADD grâce à son domaine DD peut-être directement ou indirectement couplé à des récepteurs de mort (Chinnaiyan et al., 1995) (Hsu et al., 1995) (Pan et al., 1997) (**Figure 9**). Le complexe ainsi constitué du récepteur, des protéines adaptatrices et des pro-caspases est nommé DISC (Death Inducing Signalling Complex).

La pro-caspase 2 pourrait être aussi recrutée sur le récepteur TNFR1 via l'association séquentielle des protéines adaptatrices : RIP, TRADD (Stanger et al., 1995) et RAIDD (Duan and Dixit, 1997). En cas de grave dommage à l'ADN, la protéine PIDD (p53-induced protein with death domain) se lie à RAIDD permettant dans un second temps de recruter et d'activer la pro-caspase 2. Ce complexe de protéines est appelé le piddosome (Tinel et al., 2007).

#### 🌀 L'activation de la caspase 9 par association avec un régulateur

Le mode d'activation de la caspase 9 est plus complexe. Il nécessite l'association de la sous-unité régulatrice de la pro-caspase 9 avec Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor-1*) l'homologue de CED-4 (Rodriguez and Lazebnik, 1999; Srinivasula et al., 1998). Contrairement à la plupart des caspases, le clivage de la pro-caspase-9 n'a que peu d'effet sur son activité catalytique (Stennicke et al., 1999). L'action d'Apaf-1 requiert absolument la présence du cytochrome-c et d'ATP (Li et al., 1997). Lorsque les cellules sont quiescentes, Apaf-1 est séquestré à la surface de la mitochondrie dans une conformation tridimensionnelle inactive (Zou et al., 1997). Dans un contexte apoptotique, l'ATP va permettre un changement de conformation d'Apaf-1 de telle sorte qu'il puisse lier le cytochrome c libéré de la mitochondrie et démasquer son domaine de liaison de type CARD. Ce pré-complexe peut alors recruter la pro-caspase 9 via son domaine CARD et ainsi conduire à son activation. Le complexe multimoléculaire ainsi formé est appelé apoptosome (Zou et al., 1999). Une étude en microscopie cryo-électronique de l'apoptosome a permis de déterminer une structure heptamérique en forme de roue (Acehan et al., 2002) (**Figure 5**). C'est au sein de cette structure que la pro-caspase 9 s'active et amorce une cascade d'activation de caspases en clivant les caspases 3 et 7 (Adrain and Martin, 2001).

### b) Les substrats des caspases

La spécificité des caspases pour leur substrat est déterminée par la nature du résidu en position P4 du site de clivage (WExD, DExD, [L/V]ExD) qui a permis de définir trois groupes (**Tableau 1**) :

Groupe I	WExD	Caspases 1, 4, 5
Groupe II	DExD	Caspases 2, 3, 7
Groupe III	(L/V)ExD	Caspases 6, 8, 9, 10

**Tableau 1 : Spécificité protéolytique des caspases**

Le rôle des caspases dans l'apoptose est principalement exécutif. Les caspases fonctionnent principalement en activant des protéines impliquées dans le déroulement de l'apoptose ou en inactivant des protéines contribuant au maintien de l'intégrité cellulaire, à la régulation de la réparation de l'ADN ou impliquées dans le cycle cellulaire (Earnshaw et al., 1999; Fischer et al., 2003; Thornberry and Lazebnik, 1998; Timmer and Salvesen, 2007). Ces protéines cibles regroupent des protéines cytoplasmiques, nucléaires, des protéines impliquées dans la transduction du signal, le métabolisme, la régulation du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN. Les protéines kinases et les protéines de régulation de l'apoptose sont aussi des substrats des caspases.

- ⊗ Historiquement, le premier substrat identifié a été l'enzyme nucléaire PARP (poly-ADP-ribose-polymérase) participant à la réparation de l'ADN. L'enzyme PARP catalyse le transfert de polymères d'ADP-ribose sur les protéines nucléaires facilitant ainsi la réparation de l'ADN. Sa coupure par les caspases 3 et 7, au niveau de la séquence DEVD-G, est l'un des premiers signes détectables de l'apoptose. Ce clivage compromet l'activité de réparation de PARP et contribue à la destruction du noyau. (Lazebnik et al., 1994)
- ⊗ Le clivage de l'ADN au cours de l'apoptose est dû à l'activation des endonucléases CAD (caspase-activated DNase). La caspase 3 est à l'origine de la dégradation de la protéine ICAD, un inhibiteur des endonucléases (Enari et al., 1998; Nagata, 2000). Ces enzymes sont alors libres de cliver l'ADN entre les nucléosomes libérant ainsi des fragments dont les longueurs sont des multiples de 180 pb, excellents marqueurs pour caractériser l'apoptose.

- Ⓢ La condensation de la chromatine et le remodelage du noyau a lieu suite au clivage d'une hélicase de l'ADN (Kovacsovics et al., 2002; Sahara et al., 1999).
- Ⓢ Le bourgeonnement de la membrane plasmique et la formation des corps apoptotiques passent par l'activation de la kinase PAK2 (p21-activated protein kinase 2) (Lee et al., 1997) et ROCK1 (Rho-associated kinase 1) (Coleman et al., 2001) par la caspase 3.
- Ⓢ La modification de la morphologie de la cellule est aussi due à la destruction par les caspases de protéines du cytosquelette telles que l'actine (Mashima et al., 1997) et les filaments intermédiaires (Chen et al., 2001) comme la vimentine (Byun et al., 2001). Les caspases dégradent également FAK (Focal adhesion Kinases) (Wen et al., 1997), p130Cas (Crk-associated substrate) (Kook et al., 2000) ou la Paxillin (Lesay et al., 2001) qui régulent l'adhérence cellulaire. Le clivage de ces protéines provoque le détachement de la cellule.
- Ⓢ La dégradation des organites a lieu au cours de l'apoptose. L'intégrité de l'appareil de Golgi est perturbée par le clivage des protéines golgin-160 et GRASP65 (Lane et al., 2002) (Mancini et al., 2000). Le transport entre le reticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi est également stoppé par la dégradation de Bap 31 (Ng et al., 1997).
- Ⓢ Les caspases assurent également la protéolyse de substrats tels que Akt (Widmann et al., 1998), CREB (Francois et al., 2000) et NFκB (Ravi et al., 1998) impliqués dans les voies de survie et inhibent également les régulateurs anti-apoptotiques tels que Bcl-2 (Cheng et al., 1997) et c-IAP1 (Clem et al., 2001).

L'activation des caspases a été récemment démontrée dans de nombreuses pathologies. Le clivage des différents substrats des caspases contribue non seulement à la destruction cellulaire mais pourrait aussi jouer un rôle actif dans la progression de la maladie, rôle particulièrement bien étudié dans les maladies neurodégénératives (voir Chapitre 2). Au cours de la maladie d'Alzheimer, la caspase 3 clive et inactive les présénilines augmentant la production de  $\beta$ -amyloïde induisant la mort neuronale (Kim et al., 1997). La caspase 3 peut également cliver l'APP sur un site différent de celui de la  $\gamma$ -sécrétase. Le produit de ce clivage favoriserait également la production du peptide  $\beta$ -amyloïde (Gervais et al., 1999). La maladie de Huntington est due à l'expansion de triplets CAG à l'extrémité 5' du gène codant pour la Huntingtin. Le produit de clivage de la protéine Huntingtin par la caspase 3 forme des agrégats et des inclusions nucléaires cytotoxiques qui déclencherait directement la mort neuronale (Goldberg et al., 1996).

#### **IV. Les voies moléculaires impliquées dans l'activation des caspases**

De nombreux signaux très différents, physiologiques comme pathologiques, intra comme extracellulaires ont été identifiés comme pouvant déclencher l'apoptose. Ainsi, l'apoptose peut être induite par la carence en facteurs de croissance (NGF, IL-2...), par certains récepteurs membranaires, appelés récepteurs de mort (FasR, TNFR), lorsqu'ils sont liés à leurs ligands respectifs (Fas, TNF) ou par des lésions cellulaires (radiations ionisantes, agents cytotoxiques, chocs osmotiques, hyperthermie). Ainsi, on distingue la voie extrinsèque de l'apoptose, stimulée par les récepteurs de mort, et la voie intrinsèque, stimulée par des signaux intracellulaires tels que l'altération de l'ADN ou la présence de molécules toxiques. La voie intrinsèque est sous le contrôle de l'interaction entre les protéines de la famille Bcl-2 et la mitochondrie. Ces signaux doivent alors être intégrés par la cellule qui, en fonction de son degré de différenciation et d'activation, va orienter sa réponse soit vers la mort, soit vers la survie, la prolifération ou la différenciation. Cette intégration fait appel à un certain nombre de médiateurs intracellulaires qui sont soit anti- soit pro-apoptotiques, soit les deux, selon le contexte cellulaire.

##### **IV.1 La voie extrinsèque des récepteurs de morts**

De nombreux stimuli sont capables d'induire l'apoptose. Toutefois il existe une famille de récepteurs spécialisés dans l'induction de la mort cellulaire programmée : les récepteurs de mort. Une fois stimulés par leurs ligands respectifs, ces récepteurs induisent l'activation des caspases.

###### **a) La superfamille des TNF (Tumor Necrosis Factor) récepteurs : présentation**

Les membres de la famille du TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor) sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques tels que les processus inflammatoires, les régulations de fonctions immunitaires mais également dans la mort cellulaire et notamment dans la mort neuronale. Les membres de cette famille sont tous des protéines transmembranaires constituées de 1 à 6 domaines extracellulaires riche en cystéine (Naismith et al., 1996) (Smith et al., 1994) et d'une région intracytoplasmique comportant une région de 80 acides aminés appelée domaine de mort ou « death domain » (DD) (Ashkenazi and Dixit, 1998) (Nagata, 1997) (Boldin et al., 1995a) (Boldin et al., 1995b) (Chinnaiyan et al., 1995) (**Tableau 2**). Les

deux récepteurs de mort les mieux caractérisés sont Fas (aussi appelé CD95/ApoI) (Itoh et al., 1993) (Oehm et al., 1992) et le TNFR1 (Tumor Necrosis Factor receptor aussi appelé p55) (Loetscher et al., 1990) (Schall et al., 1990). D'autres récepteurs font partie de cette famille : les DR récepteurs (Death receptors) tel que DR3 (Chinnaiyan et al., 1996a) et DR6 (Pan et al., 1998), les TRAIL récepteurs (Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand) (Locksley et al., 2001) et le récepteur p75 nerve growth factor ( $p75^{\text{NGFR}}$ ) (Liepinsh et al., 1997) (Walczak and Krammer, 2000). Les différents ligands activant ces récepteurs, à l'exception du NGF, sont structurellement très proches et font partie de la famille du TNF (Smith et al., 1994).

Ligands (nouvelle nomenclature)	Récepteurs (nouvelle nomenclature)
TNF (TNFSF2)	TNFR1 (TNFSFR1A) TNFR2 (TNFSFR1B)
LT $\alpha$ (TNFSF1)	TNFR1 (TNFSFR1A) TNFR2 (TNFSFR1B)
FasL (TNFSF6)	Fas (TNFSFR6)
TRAIL (TNFSF10)	TRAIL-R1 (DR4, TNFSFR10A) TRAIL-R2 (DR5, TNFSFR10B) TRAIL-R3 (DcR1, TNFSFR10C) TRAIL-R4 (DcR2, TNFSFR10D)
TL1A	DR3 (TNFRSFR25)
?	DR6
NGF	$P75^{\text{NGFR}}$ (TNFRSFR16)

**Tableau 2 : Les membres de la superfamille du TNF et leurs ligands : ancienne nomenclature et nouvelle nomenclature (à partir de la revue de Locksley et al., 2001).**

L'activation de ces différents récepteurs conduit au recrutement d'une plateforme de protéines intracellulaires connue sous le nom de DISC (Death Inducing Signaling Complexe) qui permettra, dans la majeure partie des cas, l'activation des caspases et le déclenchement de la mort (Ashkenazi and Dixit, 1998) mais qui peut contrôler également d'autres voies de signalisation telles que les voies de survie.

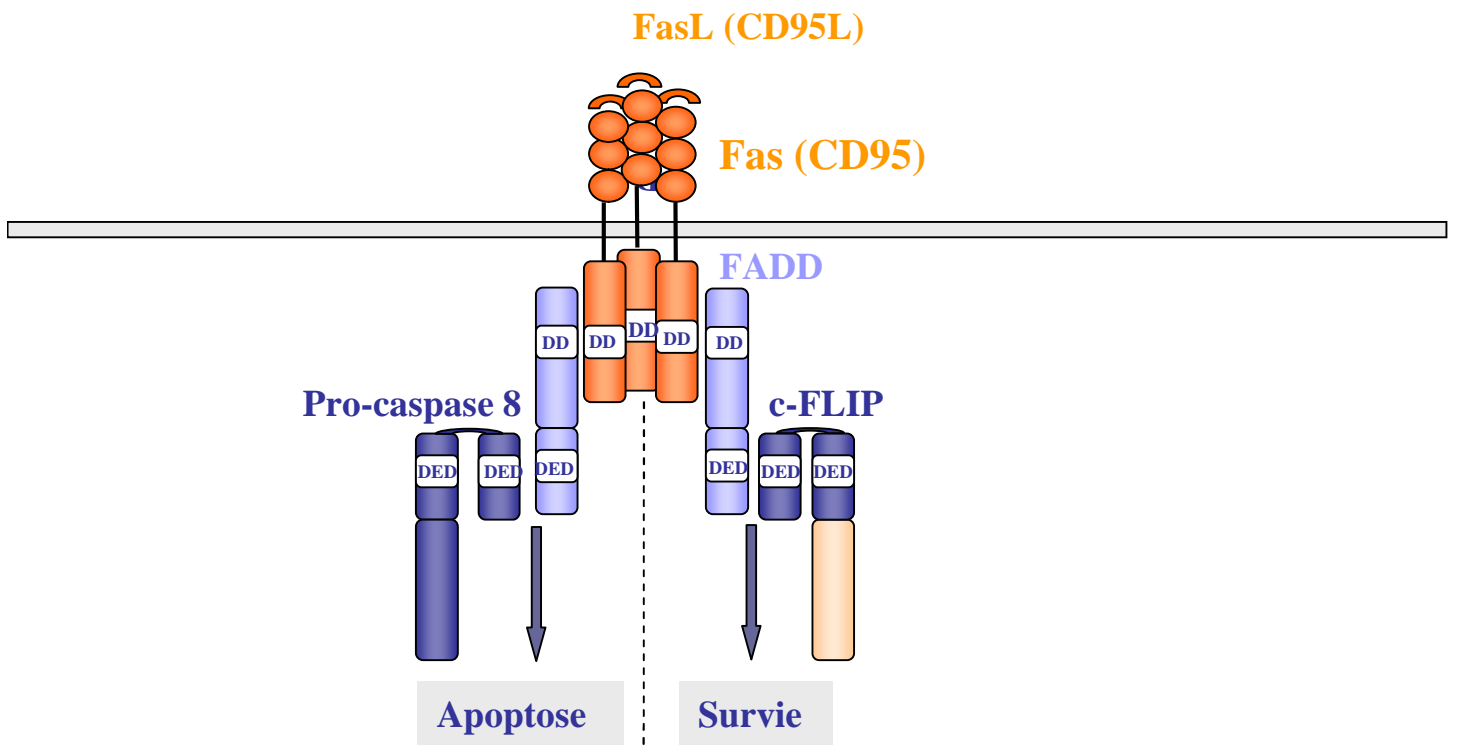
**b) Les mécanismes moléculaires d'activation de Fas/FasL :**

La liaison de FasL sur Fas conduit à la trimérisation du récepteur (Smith et al., 1994) permettant ainsi le recrutement de la protéine adaptatrice intracellulaire FADD (Chinnaiyan et al., 1995) (Boldin et al., 1995b) (**Figure 6**).

- Ⓢ FADD, aussi connu sous le nom de MORT1 (mediator of receptor-induced cytotoxicity 1), a été identifiée par Kischkel en 1995 (Kischkel et al., 1995). FADD se fixe à la partie intracytoplasmique du récepteur Fas : FADD possède, dans sa partie C-terminale, un domaine de mort ou « death domain » (DD) homologue à celui du récepteur Fas qui permet son association avec celui-ci (Boldin et al., 1995a) (Chinnaiyan et al., 1995) (Muzio et al., 1998). A son autre extrémité, FADD possède un domaine effecteur de mort (DED) qui permet une interaction directe avec le domaine homologue de la pro-caspase 8 (Boldin et al., 1996) (Muzio et al., 1996). Une protéine FADD tronquée dans son domaine DED ne peut induire l'activation de l'apoptose (Chinnaiyan et al., 1996b). FADD est donc indispensable au recrutement et à l'activation de la caspase 8. Les motoneurons issus de souris transgéniques exprimant un dominant négatif de FADD (FADD-DN) sont résistants à la mort induite par FasL (Ugolini et al., 2003). FADD possède également des séquences de localisation nucléaire lui permettant de faire très rapidement la navette entre le cytoplasme et le noyau (Thorburn, 2004). Il n'a pas été clairement établi un lien entre la localisation nucléaire de FADD et son rôle dans la mort cellulaire suggérant d'autres fonctions pour FADD.

L'association du récepteur Fas avec FADD et la pro-caspase 8 forme le complexe de signalisation de la mort induite ou DISC (Kischkel et al., 1995). La pro-caspase 8 au niveau du DISC subit un clivage auto-catalytique lui permettant de prendre sa forme active (Muzio et al., 1998) (Martin et al., 1998) (Salvesen, 1999). La trimérisation du récepteur permet un enrichissement local en cette enzyme (une molécule de pro-caspase 8 étant recrutée pour chaque molécule de récepteurs) favorisant ainsi son auto-activation. La délétion du gène de la caspase 8 chez la souris bloque les voies de mort du TNFR1 et de Fas suggérant que la caspase 8 est la caspase initiatrice impliquée dans les voies de signalisation de la famille des récepteurs de mort (Varfolomeev et al., 1998). La caspase 8 active va directement cliver et activer la caspase 3, initiant l'activation des caspases effectrices (Slee et al., 1999) qui va





**Figure 6 : Schéma de l'activation de la voie du récepteur Fas (CD95).**

L'association de Fas avec son ligand FasL permet le recrutement de FADD sur son domaine de mort (DD). L'association de FADD à la pro-caspase 8 via son domaine effecteur de mort (DED) déclenchera la voie apoptotique. c-FLIP peut également se lier à FADD via son domaine DED empêchant le recrutement de la caspase 8, son activation et donc protégeant la cellule de la voie de mort.

mener la cellule à la mort (**Figure 6**). FADD et la caspase 8 peuvent être recrutés directement mais en faible quantité à la membrane plasmique sur Fas. Lee et al ont montré par différentes approches, notamment en bloquant la voie clathrine dépendante par des siRNA ou en utilisant des mutants du récepteur Fas que c'est l'internalisation du récepteur, grâce à la formation de vésicules d'endocytose par un processus encore mal défini, qui permet d'amplifier le recrutement du DISC et le déclenchement de la voie de mort (Algeciras-Schimnich et al., 2002) (Lee et al., 2006) (**Figure 7**). Lee et al ont utilisé une technique permettant d'isoler spécifiquement les endosomes contenant le récepteur Fas. Ils ont ainsi pu mettre en évidence que FADD et la caspase 8 sont principalement recrutés sur le récepteur Fas situé au niveau des endosomes alors appelés réceptosomes (Lee et al., 2006).

### **c) Les voies de signalisations des TNF récepteurs**

Le facteur nécrosant les tumeurs, appelé TNF (Tumor Necrosis Factor), se présente sous deux formes  $\alpha$  et  $\beta$ . Les nombreuses activités biologiques du TNF  $\alpha$  sont identiques à celles du TNF  $\beta$ , bien que celui ci ait une activité spécifique moindre. Le TNF  $\alpha$  est produit par les macrophages. Le TNF $\alpha$  est une molécule clé, impliquée dans les réponses immunitaires et inflammatoires, produite rapidement par les macrophages afin d'activer le processus de défense et contribuer à l'élimination des agents pathogènes. Le TNF $\alpha$  participe à la destruction des cellules tumorales.

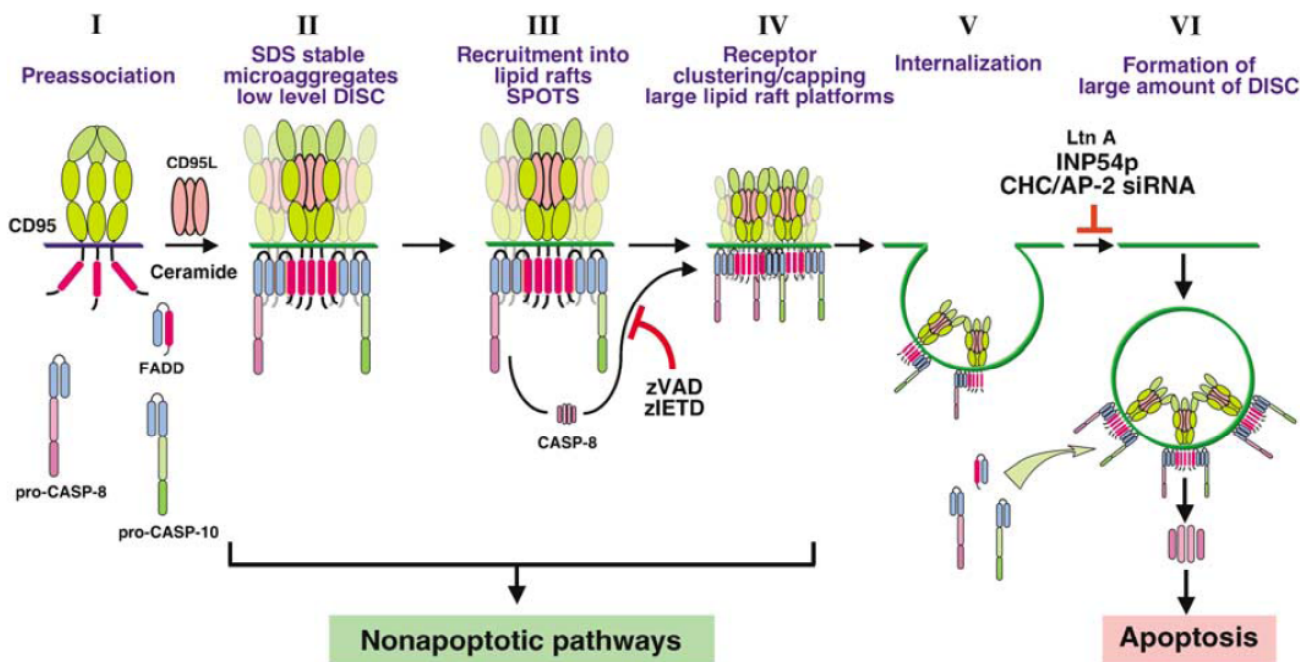
Il existe deux types de récepteurs liant le TNF : le TNFR1 et le TNFR2.

- **Le TNFR1**

Comme pour le récepteur Fas, le déclenchement des voies de signalisation du TNFR1, la voie de survie NF $\kappa$ B et la voie de mort, passe par la formation d'une plateforme protéique intracellulaire appelée DISC.

#### *La trimérisation du TNFR1*

Le TNFR1 est un récepteur stocké majoritairement dans la région péri-nucléaire au niveau du trans-golgi en absence de toute stimulation. Suite à une stimulation de son ligand, la cytokine TNF $\alpha$ , TNFR1 se relocalise à la membrane plasmique (Gaeta et al., 2000) (Jones et al., 1999) (Storey et al., 2002) (Todd et al., 2004).



**Figure 7: Modélisation du signal initial responsable de l'activation de la voie CD95 (Fas) (Algeciras-Schimmich et al., 2002 et Lee et al 2006).**

**I.** Pré-association des monomères de récepteur en l'absence du ligand. **II.** Formation de micro-aggrégats CD95/CD95L à la membrane plasmique. La formation du DISC est possible mais en trop faible quantité pour déclencher le processus d'apoptose. **III-IV.** Recrutement et regroupement des trimères de CD95 dans des radeaux lipidiques. Cette étape nécessite l'activation de la caspase 8 par le DISC. **V-VI.** Internalisation de CD95 dans la voie endosomale, recrutement des différents membres du DISC et déclenchement de l'apoptose.

Le TNF $\alpha$  existe sous une forme membranaire mais également sous une forme soluble. Sa forme active est constituée de trois molécules identiques. Cet homotrimère doit interagir avec un trimère de récepteur pour déclencher une cascade de signalisation cellulaire. Les premiers travaux de Banner (Banner et al., 1993) suggèrent que le ligand sous forme homotrimérique provoquerait l'agrégation des monomères de récepteur. Ceci a été controversé par deux publications (Chan et al., 2000) (Siegel et al., 2000) qui montrent que l'agrégation des membres de la famille du TNFR existe avant toute interaction avec leur ligand. Cette agrégation serait même un pré-requis à l'interaction ligand-récepteur. *In vitro*, la surexpression du TNFR1 dans la lignée cellulaire HEK 293, en absence de son ligand, est suffisante pour déclencher la mort de ces cellules (Todd et al., 2004). Néanmoins, en conditions physiologiques, aucun signal de mort ne semble être transduit tant que le ligand n'interagit pas avec son récepteur. L'oligomérisation du récepteur fait intervenir son domaine extracellulaire PLAD (Pre-Ligand-Binding Assembly Domain). Ce type de domaine est retrouvé dans chacun des membres de la famille du TNFR. Cependant il existe un domaine PLAD spécifique pour chaque type de récepteur afin d'éviter toute oligomérisation hétérologue (Chan et al., 2000).

L'interaction du TNF $\alpha$  avec son récepteur entraîne le recrutement de la protéine adaptatrice TRADD.

- Ⓢ TRADD est une protéine de 34 Kd dont 118 acides amines de son domaine de mort situés dans sa partie C-terminale sont suffisants pour interagir directement avec le TNFR1. L'interaction de TRADD et de TNFR1 se fait à la membrane plasmique via une liaison homophile entre les deux domaines de morts respectifs de ces deux protéines (Hsu et al., 1995). TRADD est une protéine bivalente qui peut à la fois déclencher une voie de survie en activant le facteur NF $\kappa$ B par son interaction avec la protéine TRAF-2 (TNF receptor-Associated Factor) ou bien la voie de mort du TNFR1 en permettant le recrutement de FADD. La surexpression de TRADD tend plutôt à activer cette dernière et est suffisante pour induire la mort (Hsu et al., 1995).

En condition physiologique, le TNFR1 (Tartaglia and Goeddel, 1992) (Tartaglia et al., 1993a) est lié à la protéine SODD (silencer of death domain) pour prévenir son agrégation spontanée et le recrutement du DISC. L'interaction du TNF $\alpha$  avec son récepteur entraîne le relargage de

SODD et le recrutement en quelques minutes de TRADD première protéine adaptatrice nécessaire à la formation du DISC (Hsu et al., 1995) (Micheau et al., 2003).

Deux protéines adaptatrices : la kinase RIP (Receptor-Interacting Protein) (Hsu et al., 1996a) et TRAF-2 sont recrutés via TRADD (Hsu et al., 1996b) sur le récepteur TNFR1. Une première plateforme protéique, située à la membrane plasmique, constituée de TNFR1, TRADD, RIP et TRAF-2 est appelé complexe I (Micheau et al., 2003).

- ⊗ RIP est une sérine-thréonine protéine kinase de 73kD qui a été découvert comme un interacteur de TRADD via son domaine de mort. Le domaine kinase de RIP se situe dans sa partie N-terminale tandis que son domaine de mort est dans la partie C-terminale. Le domaine kinase de RIP n'est pas nécessaire pour l'activation de la voie de survie NFκB ni pour l'activation de la voie de mort par le TNFR1. En revanche, son domaine de mort est indispensable au déclenchement de la mort. Les protéines RIP sont des substrats de la caspase 8 qui les clive en deux fragments : RIPc et RIPn. Ce clivage supprime toute action de RIP dans la voie NFκB. La surexpression de RIPc augmente l'association TNFR1/TRADD/FADD augmentant ainsi la mort des cellules induites par le TNFα (Karin and Lin Nature 2002). RIP peut également interagir très faiblement avec Fas.
  
- ⊗ La famille des TRAFs est composée de 7 protéines adaptatrices ayant en commun dans leur partie C-terminale un domaine structural extrêmement bien conservé qui leur permet d'interagir avec la protéine adaptatrice TRADD et donc indirectement avec les récepteurs de morts. Les membres de cette famille peuvent également former des homodimères ou des hétérodimères entre eux. TRAF-2 est une protéine de 56 kD impliquée dans la voie de survie NFκB et la voie des JNK (c-Jun NH2-terminal Kinase) et lie également les protéines anti-apoptotiques IAPs (Inhibitor of Apoptosis Protein). (pour revues : Bradley J Oncogene 2001; Karin and Lin Nature 2002). TRAF2 possède un domaine RING lui conférant une activité ubiquitine ligase de type E3 (Rothe et al., 1994). L'ubiquitinylation est un mécanisme d'abord décrit pour son rôle dans l'étiquetage des protéines vers le protéasome où elles seront dégradées. Depuis quelques années, il a été démontré que l'ubiquitinylation de différents acteurs de la voie de survie NFκB est une étape indispensable dans l'activation de cette voie (pour revue (Chen, 2005)). TRAF-2 conduit notamment à la poly-ubiquitinylation de

RIP lui permettant ainsi d'agir, en aval, sur d'autres interacteurs nécessaires à l'activation de la voie de survie NFκB (Xia and Chen, 2005).

TRAF-1 est une protéine de 45 kD. C'est le seul membre de la famille des TRAFs à être un substrat pour la caspase 8. Son clivage entraîne la formation de deux fragments de 28 et 22 kD. Le plus long fragment correspondant à la partie C-terminale se comporte comme un dominant négatif des protéines anti-apoptotiques IAPs et inhibe la voie de survie NFκB en séquestrant TRAF-2. La surexpression de ce domaine est suffisante pour augmenter l'apoptose.

A cette étape de la signalisation, l'engagement du TNFR1 peut induire des signaux de survie déclenchant la voie NFκB aussi bien que des signaux de mort. Si le complexe I reste à la membrane et s'associe au complexe IκKK, la voie de survie NFκB est alors activée.

#### *La voie de survie NFκB*

La voie de signalisation du facteur nucléaire NFκB joue un rôle central dans la défense immunitaire et dans les réponses inflammatoires. Elle peut être activée par une grande variété de stimuli tels que les cytokines, les ultraviolets, et les produits bactériens ou viraux déclenchant l'activation de facteurs de transcription appartenant à la famille de protéines NFκB/Rel (Ghosh et al., 1998; Karin and Lin, 2002) (Silverman and Maniatis, 2001).

NFκB est un terme collectif regroupant des dimères de facteurs de transcription de la famille Rel (l'homologue de Relish chez la drosophile). L'activité de ces dimères est régulée par leur passage du cytoplasme au noyau en réponse à une stimulation cellulaire. Chez les mammifères, la famille NFκB est constituée de 5 membres : Rel-A, c-Rel, Rel-B, p50/NFκB1 et p52/NFκB2. p50 et p52 sont produites suite à la protéolyse de leurs deux précurseurs protéiques p105 et p100 respectivement.

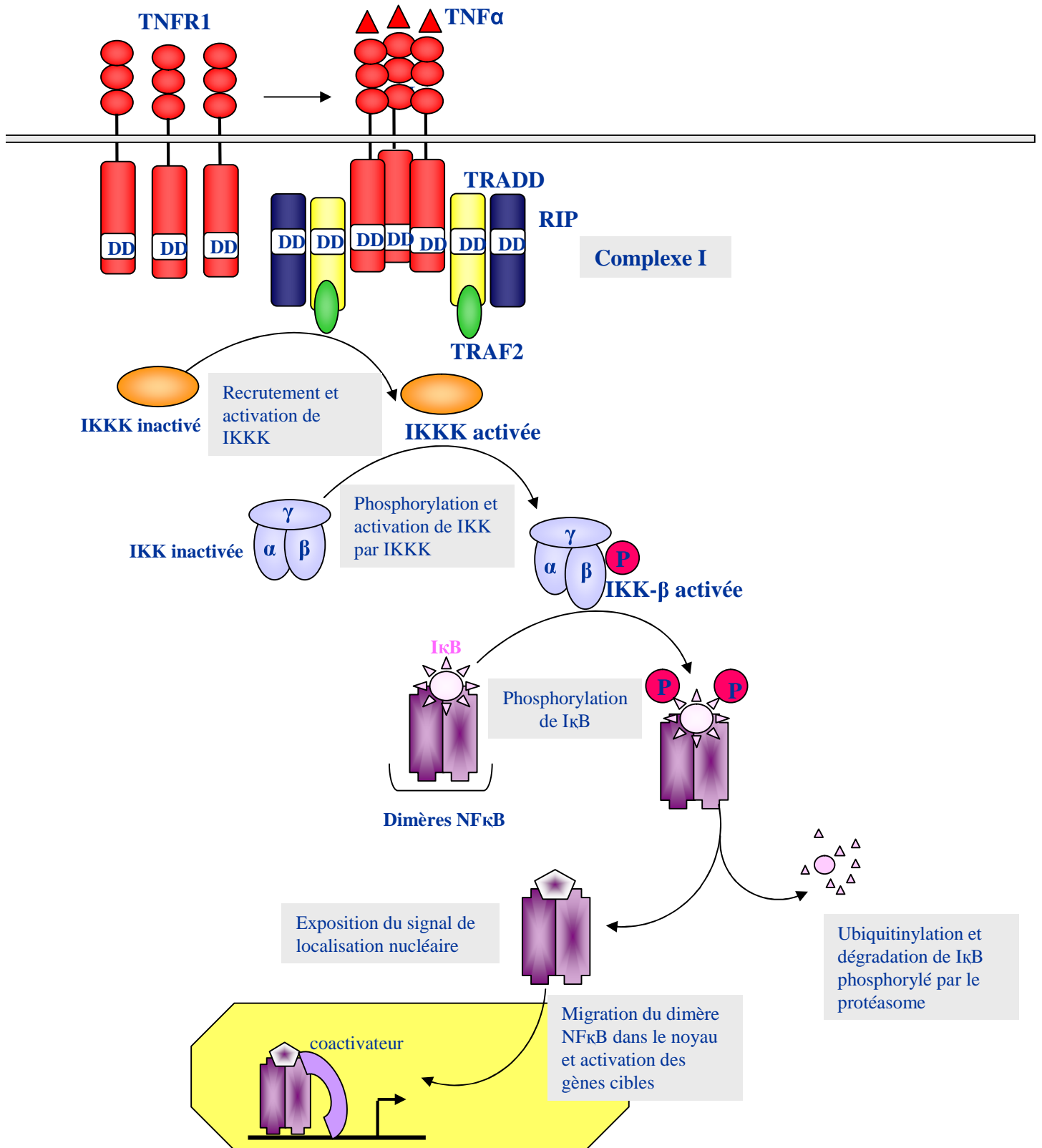
Chaque membre de la famille NFκB possède dans sa partie N-terminale, un domaine RHD (Rel Homology Domain) de 300 acides aminés. Cette région permet la dimérisation de ces protéines ainsi que leur liaison à l'ADN. Il existe un inhibiteur cytoplasmique IκB qui régule cette voie en masquant le signal de localisation nucléaire des membres de la famille NFκB, retenant ainsi ces dimères protéiques dans le cytoplasme. Le complexe I, (TNFR1/TRADD/RIP/TRAF-2) formé après la liaison du TNFα (Karin and Lin, 2002)

(Ghosh et al., 1998) (Moynagh, 2005), recrute, via TRAF-2, la kinase I $\kappa$ B kinase kinase (IKKK) qui phosphoryle et active la kinase I $\kappa$ B kinase (IKK) (Liu et al., 1996). IKK est un hétérodimère composé d'une sous-unité adaptatrice (IKK- $\gamma$  ou NEMO) et de deux sous-unités kinases (IKK- $\alpha$  et IKK- $\beta$ ). La sous-unité IKK- $\beta$  phosphoryle l'inhibiteur I $\kappa$ B induisant son ubiquitinylation et sa dégradation vers le protéasome (Li et al., 1999b). Le signal de localisation nucléaires des dimères NF $\kappa$ B ainsi mis à découvert leur permet directement de se relocaliser dans le noyau où ils activeront la transcription de gènes cibles en association avec des co-activateurs (**Figure 8**).

Il a été montré que l'activation de NF $\kappa$ B et l'induction de l'apoptose par les récepteurs de mort, sont liées par des boucles de rétrocontrôles inhibitrices. De ce fait, la voie de signalisation NF $\kappa$ B régule négativement l'apoptose induite par les récepteurs de mort en augmentant l'expression de protéines anti-apoptotiques. Ainsi, l'activation de NF $\kappa$ B augmente l'expression de la protéine FLIP (Kreuz et al., 2004) qui, en empêchant le recrutement et l'activation de la caspase 8 par FADD, est un puissant inhibiteur de la voie apoptotique des récepteurs de mort. De plus, FLIP va également augmenter l'activation de NF $\kappa$ B (Kataoka et al., 2000) formant ainsi une boucle d'autoactivation. A contrario, l'apoptose interfère avec l'activation de NF $\kappa$ B par l'intermédiaire des caspases qui clivent plusieurs composants de la voie de signalisation de NF $\kappa$ B (Tang et al., 2001) : IKK $\beta$  est clivée par la caspase 3 au cours de l'induction de l'apoptose par le TNF $\alpha$  bloquant ainsi toute possibilité d'activation de la voie NF $\kappa$ B.

#### *La voie de mort du TNFR1*

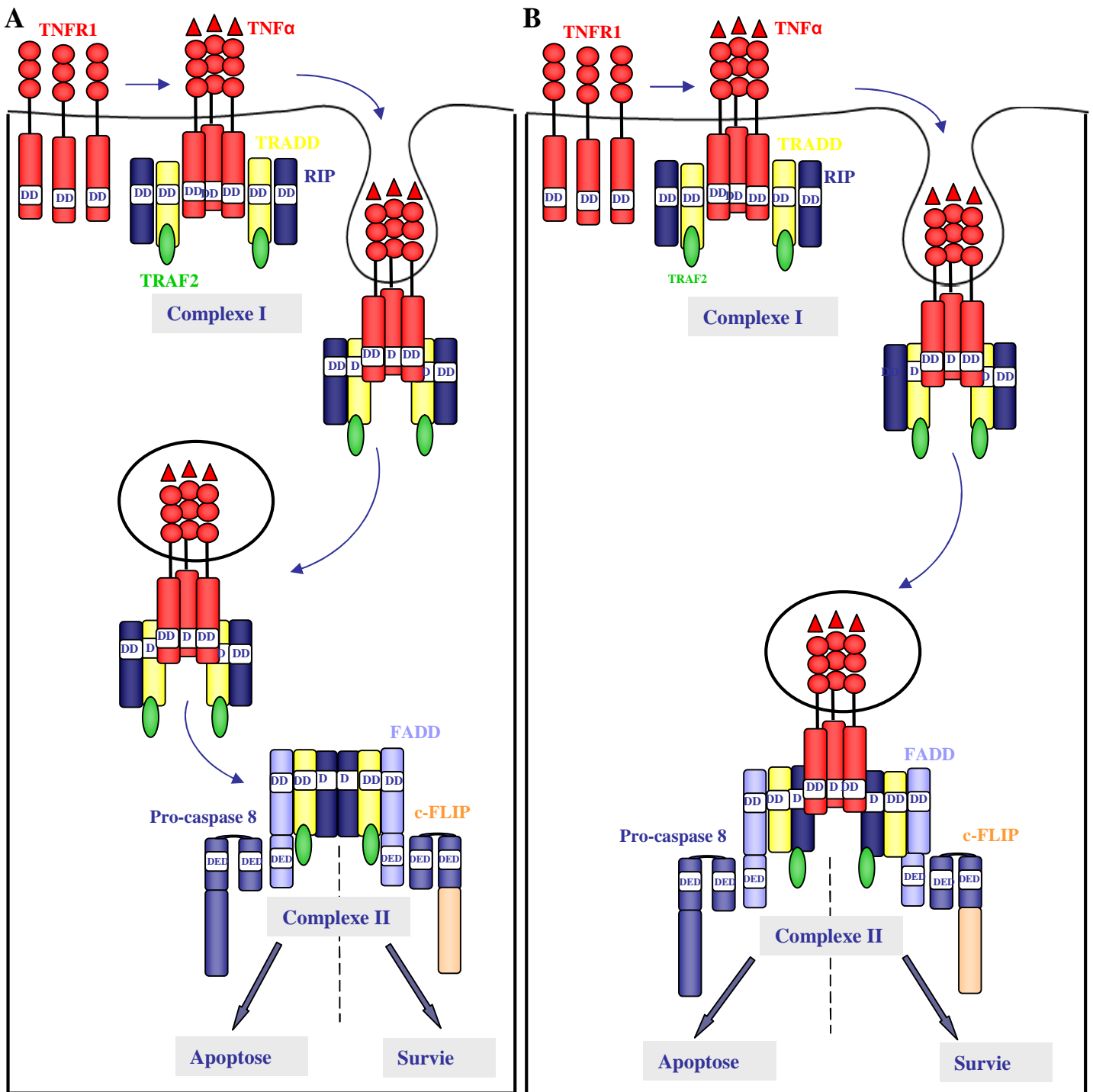
Le premier modèle proposé par Micheau et al, en 2003, suggère qu'au cours de son internalisation, une partie du complexe I constitué de TRADD, de RIP et de TRAF-2 pourrait se détacher du récepteur et se relocaliser dans le cytosol laissant le TNFR1 sur les endosomes. La dissociation de TRADD du TNFR1 permettrait de libérer son domaine de mort (DD) accessible alors au domaine de mort (DD) de FADD. La localisation de FADD sur le complexe TRADD/RIP/TRAF-2 lui permettra alors de recruter la pro-caspase 8 via une liaison homophilique entre les deux DED domaines de ces protéines (Hsu et al., 1996b) (Nagata, 1997). L'association TRADD/RIP/TRAF-2/FADD/pro-caspase 8 est appelé complexe II. La pro-caspase 8 au niveau du complexe II subit un clivage auto-catalytique lui permettant de prendre sa forme active et d'activer, en tant que caspase apicale, les caspases effectrices (Muzio et al., 1998) (Martin et al., 1998) (**Figure 9 A**). Les travaux de Harper ont



**Figure 8 : Activation de la voie NFκB par le TNFα.**

L'association de TNFα avec le TNFR1, sous forme de trimère, permet le recrutement de 3 protéines adaptatrices : RIP, TRADD et TRAF2 formant le complexe I. Si cette plate-forme protéique reste à la membrane plasmique, elle va activer le complexe IKK et déclencher la voie de survie NFκB. La sous-unité IKKβ phosphorylée va phosphoryler IκB l'inhibiteur de cette voie, provoquant son ubiquitination et sa dégradation dans la protéasome. Les dimères de NFκB sont alors libres de se relocaliser dans le noyau où ils activeront la transcription de gènes cibles.





**Figure 9 : La voie de mort du TNFR1.**

Le TNF $\alpha$  provoque la trimérisation du TNFR1 et le recrutement, à la membrane plasmique, d'une première plateforme de protéine adaptatrices : TRADD, RIP et TRAF2 formant le complexe I. Si ce complexe reste à la membrane plasmique, il induit alors la voie de survie NF $\kappa$ B (Figure 8) tandis que son internalisation engage la cellule dans la voie apoptotique.

**A. Modèle du complexe I et du complexe II.**

Une partie du complexe I va se dissocier au cours de son endocytose: TRADD, RIP et TRAF2 se détachent du TNFR1 et recrutent FADD puis la pro-caspase-8 formant un complexe II cytosolique, responsable de l'activation de la voie apoptotique.

**B. Modèle des « endosomes de mort ».**

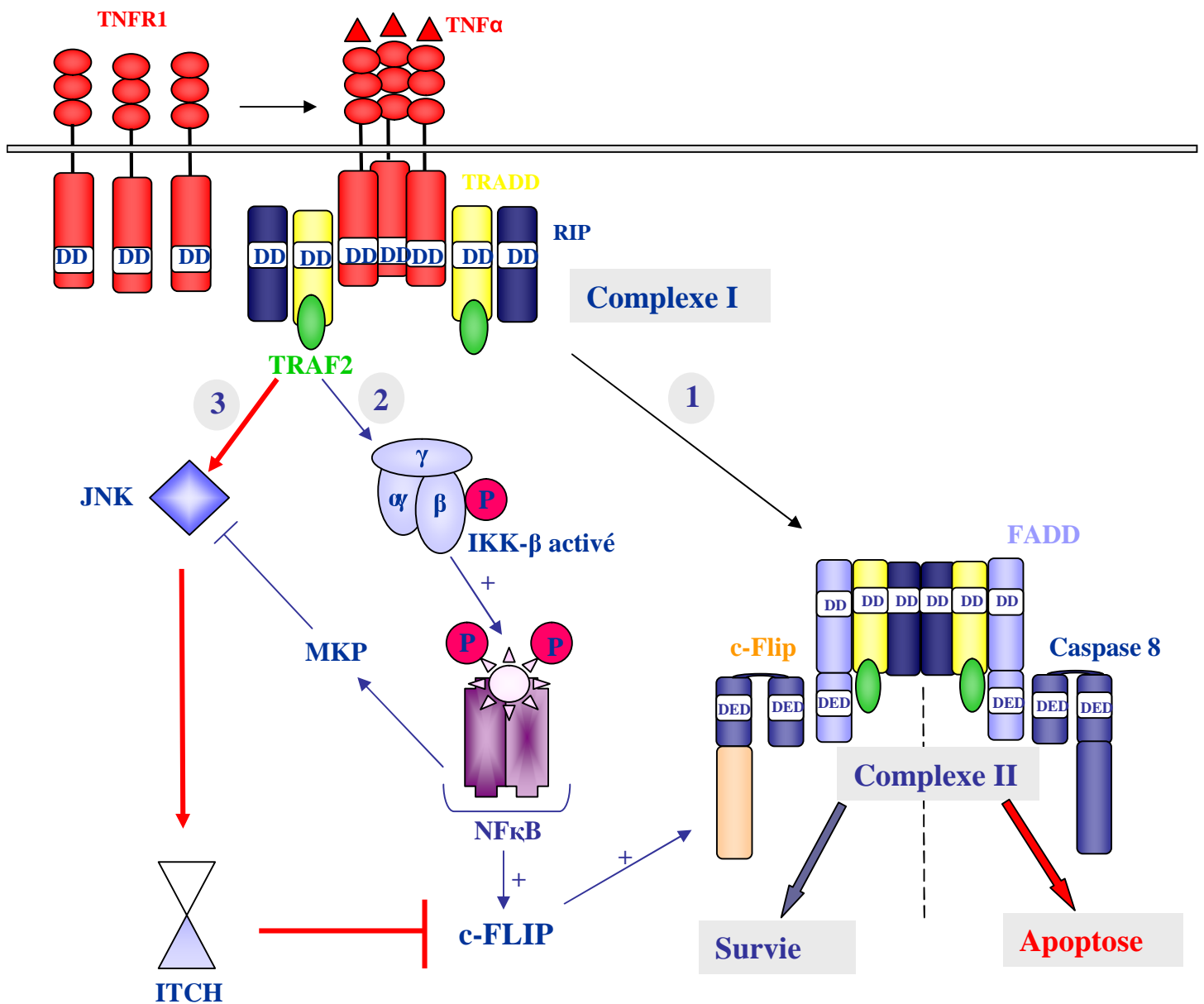
Le complexe I reste intègre au cours de son endocytose et recrute FADD et la pro-caspase 8 déclenchant la voie apoptotique au niveau des endosomes alors appelés « endosomes de mort ».

renforcé ce modèle en montrant l'absence d'interaction entre le TNFR1, FADD et la caspase-8 (Harper et al., 2003).

L'année suivante, de nouvelles données publiées par le laboratoire de Schütze modifient le modèle du Complexe I/Complexe II proposé par Micheau et al (Schneider-Brachert et al., 2004). L'équipe de Schütze a créé un mutant du TNFR1 déleté de son domaine d'internalisation (TNFR1 $\Delta$ TRID). Ce mutant, qui n'est plus capable d'être endocyté, n'induit plus la mort. L'internalisation du récepteur, par endocytose, semble donc être le signal d'engagement du TNFR1 dans la voie de mort (Schneider-Brachert et al., 2004). Cette équipe a également démontré, en mettant en point une technique d'isolation des endosomes contenant spécifiquement le TNFR1, que TRADD, FADD, RIP1, TRAF2 et la pro-caspase 8 étaient recrutés au niveau de ces endosomes. En revanche, le mutant TNFR1 $\Delta$ TRID ne permet pas le recrutement du DISC. L'internalisation du TNFR1, déclenchée par le TNF $\alpha$ , est nécessaire pour que l'ensemble du DISC, formé de TNFR1/TRADD/RIP/TRAF-2/FADD/pro-caspase 8, se retrouve au niveau des endosomes appelés endosomes de mort ou TNF receptosomes. Au niveau de ces structures, la pro-caspase 8 est capable d'être clivée et activée (Schneider-Brachert et al., 2004). Les travaux de Goeddel (Hsu et al., 1995) et de Dixit (Chinnaiyan et al., 1995) vont dans le sens du modèle « TNF receptosome » puisqu'ils ont montré une interaction faible, mais existante, entre le TNFR1 et FADD. Ces expériences suggèrent que le complexe TNFR1/TRADD/FADD existe de façon transitoire ou requière une autre protéine pour le rendre stable (**Figure 9 B**).

#### *Rôle des JNK dans la voie du TNFR1*

Une autre voie de signalisation impliquée dans la régulation du TNFR1 est la voie des JNK qui peut être activée par divers signaux tels que les facteurs de croissance, les cytokines, l'osmolarité ou les ultraviolets. Elle va ensuite activer par phosphorylation des facteurs de transcription tel que c-Jun. La voie de signalisation des JNK a été impliquée dans la prolifération, la différenciation cellulaire mais aussi dans la prévention de l'apoptose (Davis, 2000; Pinkoski and Green, 1999; Shaulian and Karin, 2002). Pourtant, la voie des JNK a été également étudiée pour son effet pro-apoptotique dans la voie des récepteurs de morts. Il semblerait qu'un équilibre entre la voie du NF $\kappa$ B et celle des JNK détermine le devenir de la signalisation du TNF $\alpha$  : la voie NF $\kappa$ B permettrait la survie tandis que les JNK favoriseraient la voie de mort (De Smaele et al., 2001; Karin and Lin, 2002; Papa et al., 2004; Tang et al.,



**Figure 10 : Activation de la voie JNK par le TNF $\alpha$  (d'après Chang et al 2006).**

L'activation du TNFR1 par son ligand induit la formation du complexe I à la membrane plasmique conduit soit :

1. à l'activation de la voie apoptotique via la formation du complexe II et l'activation de la caspase 8.
2. à l'activation de la voie de survie NFκB via le complexe IKK induisant l'augmentation d'expression de c-FLIP. Le recrutement de la pro-caspase 8 sur la protéine adaptatrice FADD est alors inhibée par c-FLIP assurant la survie cellulaire. Le facteur de survie NFκB peut également inhiber la voie (3) des JNK par l'activation des MKP (MAP kinases Phosphatases) assurant ainsi la survie cellulaire.
3. à l'activation de la voie des JNK. La protéine JNK active l'ubiquitine ligase ITCH qui va ubiquitinyler c-FLIP qui sera alors dégradée dans le protéasome. FADD peut recruter la pro-caspase 8 déclenchant la voie de mort.

2001). Le mécanisme moléculaire par lequel les JNK agissent sur la voie de mort du TNF $\alpha$  reste encore largement inconnu. Plusieurs études ont montré que l'inhibition des caspases bloque non seulement l'apoptose, mais également l'activation des JNK (Lenczowski et al., 1997) (Deak et al., 1998) (Low et al., 1999) (Sabapathy et al., 1999) (Rochat-Steiner et al., 2000). Cependant, dans la plupart des cas, l'inhibition des JNK n'a aucun effet ou seulement un effet modéré sur l'apoptose induite par Fas ou le TNF $\alpha$ . L'activation des JNK n'est pas une étape obligatoire dans le déclenchement de la mort de la cellule par la voie des récepteurs de mort. L'équipe de Karin a montré que l'activité des JNK dans la voie de mort déclenchée par le TNF $\alpha$ , augmente la dégradation de FLIP dans le protéasome via l'ubiquitine ligase Itch favorisant ainsi le recrutement de la pro-caspase 8 sur FADD (Chang et al., 2006) (**Figure 10**).

#### *Rôle des sphingomyélinases et des céramides dans la voie du TNFR1*

Différentes sphingomyélinases, dont le pH optimum est soit neutre (N-SMase) soit acide (A-SMase), ont été impliquées dans la voie de signalisation des « sphingomyélines-céramides ». L'enzyme N-SMase est associée au feuillet interne de la membrane plasmique tandis que l'enzyme A-SMase est retrouvée dans les endosomes et les lysosomes. Cette voie consiste en l'hydrolyse de la sphingomyéline par un sphingomyélinase avec production de céramides, un second messenger sphingolipidique (Levade and Jaffrezou, 1999). Diverses études ont pu mettre en évidence la participation des sphingomyélinases neutres ou acides dans la formation des céramides au cours de l'apoptose (pour revue (Gulbins, 2003)).

L'implication des N-SMases a été décrite dans l'apoptose de divers modèles cellulaires en réponse à des stimuli aussi variés que le TNF $\alpha$  (Schutze et al., 1994), Fas (Tepper et al., 2001), l'interleukine-1 (Ballou et al., 1996) ou la déprivation en facteurs de croissance (Mathias et al., 1998). Un domaine d'activation spécifique a été découvert pour la N-SMase. Cette région peptidique nommée NSD (Neutral Sphingomyélinase Domain) sert de domaine de recrutement pour la protéine adaptatrice FAN (Factor Associated with Neutral sphingomyélinase activation) capable d'activer directement l'enzyme. Dans la voie du TNF $\alpha$ , FAN joue un rôle dans l'activation d'une sphingomyélinase neutre participant au déclenchement de l'apoptose provoquée par l'engagement du TNFR1 (Adam-Klages et al., 1996) (Adam et al., 1996). Le récepteur TNFR1 possède un domaine NSD lui permettant de se lier à FAN (Neumeyer et al., 2006). La délétion de ce domaine diminue de 50% l'effet toxique du TNF $\alpha$  (Tartaglia et al., 1993a) tandis que l'expression d'un dominant négatif de

FAN inhibe partiellement l'apoptose de fibroblastes humains en réponse au TNF (Segui et al., 2001). La production de céramides due à la stimulation d'une sphingomyelinase neutre sous le contrôle de FAN pourrait être impliquée dans la voie de mort du TNFR1 (Veldman et al., 2001) (Neumeyer et al., 2006). De nombreux travaux suggèrent que les seconds messagers sphingolipidiques, céramides et sphingosines, participent à l'apoptose via l'activation des caspases, notamment la caspase 3 (Neumeyer et al., 2006), par un mécanisme dépendant du relargage du cytochrome-c dans le cytosol (Cuvillier et al., 2001).

L'activation des A-SMases reste controversée et semble dépendre à la fois du type cellulaire et de la nature du stimulus (Lin et al., 2000) (Bezombes et al., 2001). Il existe une pro-forme inactive de A-SMase au niveau du trans-golgi. L'équipe de Schütze a montré que les « endosomes de mort » contenant le récepteur TNFR1 associé indirectement à la pro-caspase 8 par les protéines adaptatrices TRADD et FADD pouvaient fusionner avec des vésicules issues du trans-golgi permettant ainsi l'activation de la sphingomyelinase acide. La formation de céramides suite à cette activation participe à la voie de mort du TNFR1 (Neumeyer et al., 2006) (Schneider-Brachert et al., 2004).

- **Le TNFR2**

Le TNFR2 a été impliqué dans divers processus tels que la prolifération des thymocytes, la nécrose de la peau, l'apoptose des lymphocytes T matures et activés, dans la régulation de l'expression de gène de la voie de survie NFκB (Sheehan et al., 1995) (Erickson et al., 1994; Lucas et al., 1997; Tartaglia et al., 1993b). Le rôle du récepteur TNFR2 dans l'apoptose ou la survie de la cellule est mal connu. Contrairement au TNFR1, le TNFR2 ne possède pas de domaine de mort (DD) cytoplasmique (McFarlane et al., 2002) (MacEwan, 2002) et recrute les protéines adaptatrices TRAF1, TRAF2 et RIP1. L'absence ne permet pas d'expliquer clairement comment l'activation de ce récepteur peut mener à la mort. Il semble que le TNFR2 pourrait réguler l'apoptose via le récepteur TNFR1. Des travaux récents de Grell (Grell et al., 1999) suggèrent que l'activation de TNFR2 pourrait entraîner une augmentation de la synthèse de TNFα qui agirait de façon autocrine sur les récepteurs TNFR1 capables de déclencher la mort cellulaire.

**d) P75<sup>NGFR</sup>**

Le récepteur à la neurotrophine P75<sup>NGFR</sup> a une homologie avec les autres membres de la famille du TNFR et plusieurs observations montrent qu'il pourrait jouer un rôle en tant que récepteur de mort. Le mécanisme par lequel P75<sup>NGFR</sup> peut déclencher le mort cellulaire reste largement inconnu. Même si la production de céramides et l'activation des caspases 9, 6 et 3 ont été suggérés (Casaccia-Bonofil et al., 1998), TRADD, FADD et la caspase 8 ne semblent pas être impliqués dans la voie de signalisation de P75<sup>NGFR</sup>.

**IV. 2 La voie intrinsèque mitochondriale****a) Les acteurs de la voie de mort mitochondriale**

La mitochondrie joue un rôle clé dans la régulation de l'apoptose (Zamzami et al., 1996) (Kroemer, 1997) (Brenner et al., 1998). En effet, la phase effectrice de l'apoptose comporte l'ouverture des pores de transition de perméabilité (PTPC : Permeability Transition Pore Complex) des mitochondries et la libération de molécules apoptogènes telles que le cytochrome c, les caspases 2, 3 et 9, le répresseur d'inhibiteur de caspases Smac/DIABLO ainsi que le facteur AIF (voir VI). Le pore PTPC est un canal oligo-protéique constitué au niveau de la membrane externe par la porine (ou VDAC : Voltage Dependent Anion Channel), sur la membrane interne par l'ANT (Adenine Nucléotide Translocator) et d'une protéine matricielle, la cyclophiline D (Kroemer et al., 1998). Cette phase de libération est sous le contrôle de membres de la famille Bcl-2 (dont le rôle sera détaillé dans le chapitre 1 V.5). Ainsi, Bcl-2 est capable de bloquer la sortie du cytochrome-c (Kluck et al., 1997) (Vander Heiden et al., 1997) (Yang et al., 1997a) alors que Bax peut l'induire (Jurgensmeier et al., 1998). Bax, en s'associant avec le PTPC, favoriserait son ouverture, provoquant ainsi un gonflement de la matrice mitochondriale (Marzo et al., 1998). Lors de cette expansion, l'excédent de surface de la membrane interne par rapport à la membrane externe provoquerait une rupture mécanique de cette dernière. Cette perméabilisation des membranes mitochondriales s'accompagne d'une chute du potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). La protéine Bax pourrait également être à l'origine de la formation d'un pore dans la membrane mitochondriale externe soit en interagissant directement avec les lipides ou encore par auto-oligomérisation ou formation d'oligomères avec un autre membre de la même famille (Eskes et al., 2000). Dans la majorité des cas, la libération du cytochrome c est

indépendante de l'activité des caspases (Bossy-Wetzel et al., 1998). Une fois dans le cytosol, le cytochrome c interagit, en présence d'ATP, avec Apaf-1 et la pro-caspase 9 formant ainsi l'apoptosome (**Figure 5**). Cette association multiprotéique est à l'origine du clivage et de l'activation de la caspase 9 qui activera à son tour par cascade les caspases effectrices telles que les caspases 3 et 7.

### **b) La famille Bcl-2 : les régulateurs de la voie mitochondriale**

Les protéines de la famille Bcl-2 sont les principaux régulateurs du processus apoptotique. Bcl-2 a été le premier homologue de la protéine *C.elegans* CED-9 décrit chez les mammifères (Vaux et al., 1988). Cette protéine transmembranaire a d'abord été décrite comme un proto-oncogène. La surexpression de Bcl-2 permet de bloquer l'apoptose induite par de nombreux stimuli (dommages de l'ADN, irradiations, expression d'oncogènes, glucocorticoïdes,...) (Yang and Korsmeyer, 1996). D'autres protéines, se caractérisant par la présence de domaines BH 1 à 4 (Bcl-2 homology domain) (Kelekar and Thompson, 1998), ont été isolées et forment une grande famille impliquée dans la régulation de l'apoptose (**Figure 11 A**). Les membres de cette famille peuvent être classés en deux sous-famille : les protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2 et Bcl-xl et les protéines pro-apoptotiques telles que Bax, Bak, Bad, Bim (de Thonel and Eriksson, 2005). Alternativement, la distribution des domaines BH permet de regrouper cette famille en trois groupes :

#### ⓐ Les membres anti-apoptotiques

Bcl-2, Bcl-xL, présentent des homologies de séquence dans les domaines BH 1, 2, 3 et 4 et sont localisés dans la membrane extérieure mitochondriale, assurant son intégrité. Ces protéines empêchent le relargage des protéines pro-apoptotiques telles que le cytochrome c de la mitochondrie vers le cytoplasme.

#### ⓑ Les membres pro-apoptotiques

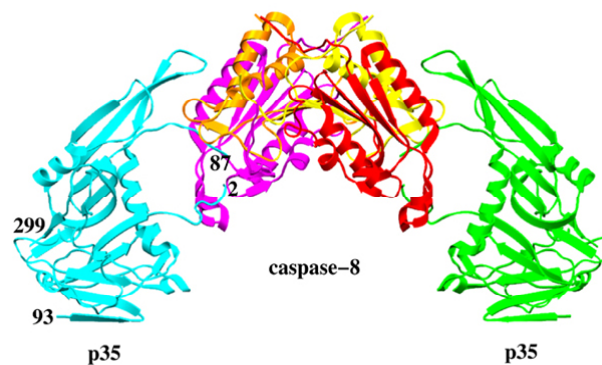
Bax, Bak, Bad présentent des homologies de séquences dans les domaines BH1, 2 et 3 mais pas ou peu dans les séquences BH4. Bax et Bak stimulent la libération des facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux.

#### ⓒ Les membres n'ayant qu'un seul domaine BH3

Ce sont des protéines pro-apoptotiques telle que Bik et Bid. Elles présentent des homologies de séquence mais uniquement dans leur domaine BH3. Bid et Bik contribuent à l'activation

A		Inhibition		
		p35	Crma	X-IAP
Inflammation	Caspase 13 (ERICE)	ND	ND	ND
	Caspase 1 (ICE)	+	++	-
	Caspase 4 (ICErelII)	+	+	ND
	Caspase 5 (ICErelIII)	ND	ND	ND
Caspases Effectrices	Caspase 3 (CPP32)	+	-	+
	Caspase 7 (Mch3)	+	-	+
	Caspase 6 (Mch2)	+	-	-
Caspases Initiatrice	Caspase 8 (MACH, FLICE)	+	+	-
	Caspase 10 (Mch4)	+	+	-
	Caspase 2 (ICH-1)	+	-	-
	Caspase 9 (Mch6)	+	ND	+

B



**Figure 12 : Effet spécifique des inhibiteurs p35, Crma et X-IAPs sur chacune des caspases.**

A. Tableau général. Les caspases sont classées en fonction de leur rôle cellulaire.

B. Inhibition covalente révélée par la structure en cristallographie du complexe Caspase 8/p35 (Xu G et al, Nature 2001)



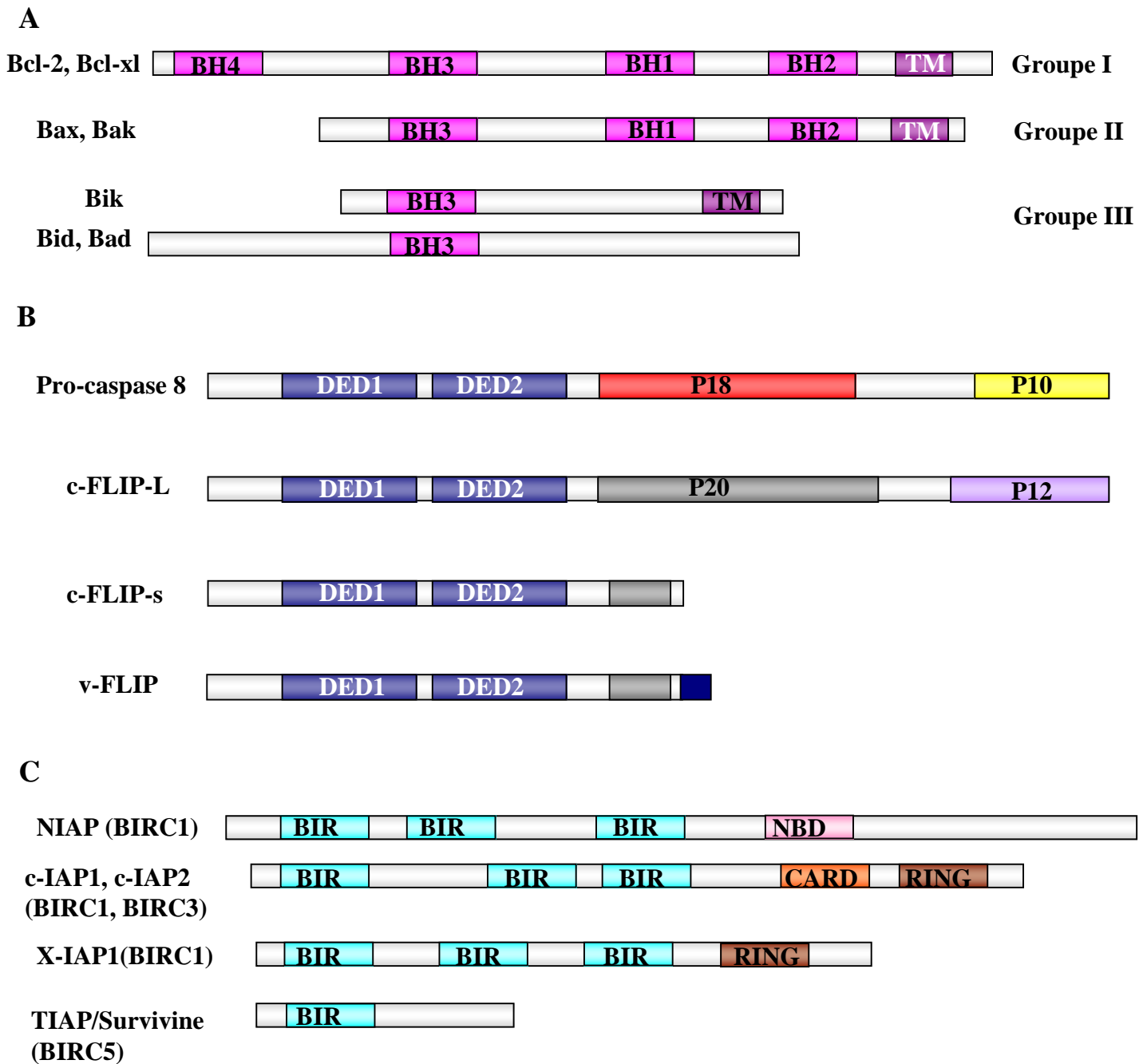
des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2. Par exemple, Bid contribue à l'activation de Bax en permettant son oligomérisation et sa translocation vers la mitochondrie.

Les membres de la famille Bcl-2 ont la capacité de former des homo- ou des hétérodimères. Il semble que l'équilibre, entre la vie et la mort, soit régulé par le type et la proportion des dimères anti- ou pro-apoptotiques (Oltvai et al., 1993).

## **V. La régulation des signaux apoptotiques**

### **V.1 Flip : le régulateur de la voie des récepteurs de morts**

La protéine FLIP, aussi appelée CASH, Casper, CLARP, FLAME, I-FLICE ou Usurpin, est une isoforme de la pro-caspase 8 contenant 2 domaines DED mais pas de site catalytique. Elle agit en entrant en compétition avec les caspases 8 et 10 et en empêchant leur recrutement au niveau des récepteurs de mort (notamment Fas et TNFRI) (Bump et al., 1995) (**Figure 6**). Cette famille d'inhibiteurs de caspases a été identifiée à l'origine chez le virus de l'herpès et le virus molluscipox (Bertin et al., 1997) (Thome and Tschopp, 2001). Il existe une grande variété de transcrits de FLIP (Komiyama et al., 1994). Le transcrit le plus long (FLIP<sub>L</sub>) possède, en plus des deux DEDs, l'équivalent d'un domaine caspase inactif. La forme courte (FLIP<sub>S</sub>), pour sa part, ne présente que les deux DEDs (Irmeler et al., 1997) (Krueger et al., 2001). FLIP a été décrit comme pouvant protéger de l'apoptose (Hu et al., 1997) (Irmeler et al., 1997) (Srinivasula et al., 1997) (Rasper et al., 1998) ou induire l'apoptose (Han et al., 1997) (Inohara et al., 1997) (Shu et al., 1997) selon la nature du transcrit et le type cellulaire considéré. Cependant, dans des conditions physiologiques, FLIP semble fonctionner comme un inhibiteur de la pro-caspase-8. Ces protéines fonctionnent comme des leurres de FADD en entrant en compétition avec les caspases 8 pour leur recrutement au niveau du DISC. Ainsi, il a été montré que la sensibilité des cellules T à l'apoptose induite par Fas était corrélée avec la diminution du taux d'ARN messenger de FLIP (Thome and Tschopp, 2001) (Lens et al., 2002) (**Figure 11 B**).



**Figure 11 : Trois familles de régulateur de la mort cellulaire**

A. Les membres pro- ou anti-apoptotiques de la famille Bcl-2.

B. Similarité structurale entre la pro-caspase 8 et les membres de la famille c-FLIP. Les différents membres d'une même famille possèdent des domaines conservés : BH (Bcl-2 Homology), BIR (Baculoviral IAP Repeat), CARD (Caspase Recruitment Domain), DED (Death Effector Domain), NBD (Nucleotide Binding Domain), RING (Zinc Finger), TM (Transmembranaire domain).

C. Les membres de la famille des IAPs.

## V.2 Les IAPs

Les IAPs (Inhibitor of Apoptosis Protein) ont d'abord été découvertes chez baculovirus en 1993 par criblage génétique pour isoler des régulateurs de la viabilité des cellules hôtes durant l'infection virale. L'effet protecteur des IAPs est dû à leur capacité à inhiber l'activation et donc l'activité de certaines caspases (voir revue (Karin and Lin, 2002) (de Thonel and Eriksson, 2005)). Des orthologues ont été découverts dans d'autres espèces, entre autres chez la drosophile, la souris et l'homme. Au moins 8 homologues ont été identifiés chez les mammifères. Les IAP, à l'exception de la survivine, sont caractérisées par 3 domaines BIRs (Baculovirus IAP Repeat) dans leur partie N-terminale et un domaine d'interaction protéine-protéine contenant un atome de zinc (RING finger) dans la partie C-terminale (**Figure 11 C**). Ce domaine RING possède une activité E3 ubiquitine ligase. c-IAP1 et c-IAP2 ont en plus un domaine CARD (Caspase Recruitment Domain).

Les IAPs inhibent les caspases par deux mécanismes distincts :

- ⊗ Les domaines BIR des IAPs permettent d'inhiber les caspases en interagissant directement avec elles (Roy et al., 1997). Par exemple, c-IAP1 et c-IAP2 se lient directement aux caspases exécutrices 3 et 7 bloquant leur activation (Deveraux et al., 1997) (Takahashi et al., 1998). Les c-IAP1 et 2 ne lient pas directement la caspase 8 et pourtant sont capables de réguler son activation. Leurs liaisons aux protéines adaptatrices TRAF-1 et TRAF-2 grâce à leur motif BIR seraient suffisantes pour inhiber le recrutement et l'activation de la caspase 8. X-IAP est capable de se lier à la fois à la caspase initiateur 9 et aux caspases exécutrices 3 et 7 inhibant ainsi leur activité.
- ⊗ Le domaine RING de X-IAP, c-IAP1 et c-IAP2 permet l'ubiquitination des pro-caspases 3 et 7 (pour revue (Vaux and Silke, 2005)). L'activité E3 ubiquitine ligase des IAPs leur confère un rôle dans le couplage covalent de l'ubiquitine sur des protéines cibles, ici les caspases. La fonction de cette réaction de couplage est de marquer les protéines destinées à être dégradées par le protéasome ou le lysosome (Vaux and Silke, 2005). Une cascade de 3 réactions enzymatiques catalyse la conjugaison de l'ubiquitine aux résidus lysines des protéines cibles. La première enzyme E1 active l'ubiquitine puis la transmet à une enzyme conjugaison E2 qui, seule, ou de concert avec l'ubiquitine ligase E3 va fixer l'ubiquitine au substrat (Vaux and Silke, 2005). La poly-ubiquitination des protéines cibles entraîne leur dégradation

dans le protéasome. C'est le cas pour la caspase 3 active qui est poly-ubiquitinée par X-IAP. Cependant, l'ubiquitination ne conduit pas systématiquement à une dégradation ciblée. Dans certaines situations, elle peut modifier l'activité biologique ou la localisation sub-cellulaire d'une protéine, en particulier dans le cas d'une mono-ubiquitination (Hoeller et al., 2006). c-IAP2 mono-ubiquitinise les pro-caspase 3 et 7 empêchant leur activation (Huang et al., 2000). Les IAPs pourraient donc empêcher donc l'activation des caspases à travers la monoubiquitination ou permettent la dégradation, par le protéasome, des caspases déjà activées dans le cas d'une polyubiquitination.

### **V.3 p35 et CrmA**

p35 est une des protéines de baculovirus utilisée classiquement en laboratoire pour sa capacité à inhiber une grande variété de caspases (**Figure 12**). CrmA (Cytokine response modifier A) est issu d'un gène précoce du cowpox virus. CrmA a un effet inhibiteur sur l'inflammation ainsi que sur le recrutement des macrophages aux sites de l'infection (Palumbo et al., 1989). Sa surexpression permet d'inhiber l'apoptose induite par la déprivation en facteur de croissance ou par les ligands CD95 et TNF $\alpha$  (Gagliardini et al., 1994) (Tewari et al., 1995). CrmA inhibe l'activité protéolytique des caspases 1, 8 et dans une moindre mesure la caspase 6 (**Figure 12**). D'autres caspases, comme la 3 ou la 7, ne sont que peu affectées par cette molécule (Nicholson et al., 1995) (Zhou et al., 1997). Ces deux protéines virales (CrmA et p35) sont des inhibiteurs compétitifs. Une fois clivées par une caspase, elles vont se lier à ces enzymes et ainsi empêcher la dégradation de nouveaux substrats (Komiyama et al., 1994) (Bump et al., 1995).

### **V.4 Smac/DIABLO**

Smac (Second Mitochondria-derived Activator of Caspase) et DIABLO (Direct IAP Binding protein with Low pI) sont une seule et même protéine identifiée par deux équipes en 2000 (Wu et al., 2000) (Verhagen and Vaux, 2002). De façon usuelle, cette protéine s'appelle désormais Smac/DIABLO et possède des similitudes avec les protéines Grim, Reaper et HID connues chez la drosophile. Ces dernières bloquent l'activité anti-apoptotique des IAPs, tout comme Smac/DIABLO chez les mammifères. Smac/DIABLO est synthétisée dans le cytoplasme est importée dans la mitochondrie où elle acquiert son activité pro-apoptotique par homodimérisation (Chai et al., 2000). Au cours de stimuli apoptotiques, Smac est libéré dans

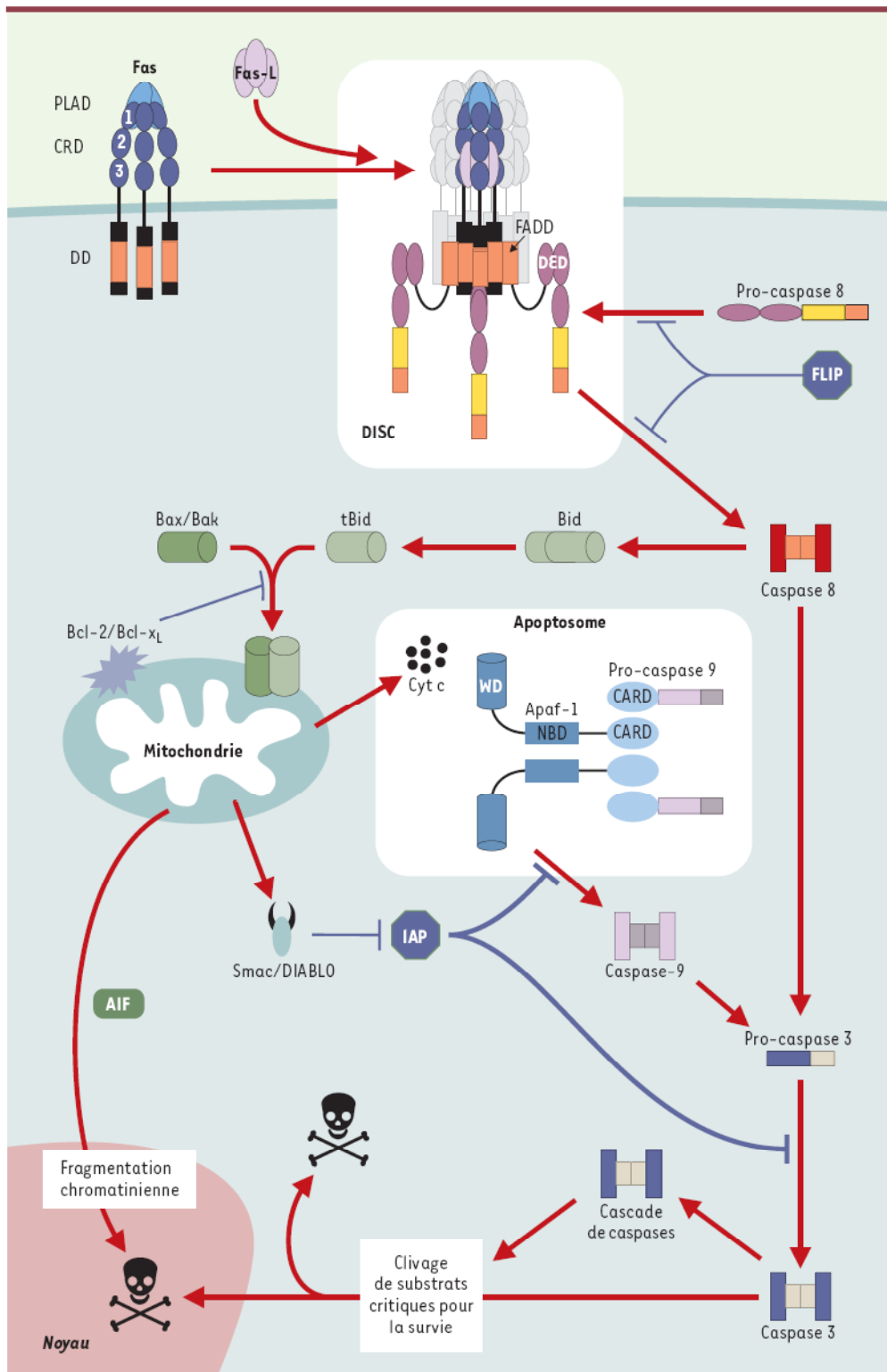
le cytosol (Adrain et al., 2001) et va se lier au domaine BIR des IAPs inhibant ainsi leur liaison aux caspases (Srinivasula et al., 2001) (**Figure 13**).

### **V.5 La régulation par compartimentation sub-cellulaire des caspases**

Longtemps les pro-caspases ont été décrites comme des protéines uniquement localisées dans le cytosol. Des études récentes ont montré que certaines caspases sont également présentes dans la mitochondrie. En effet les formes zymogènes de la caspase 2 et 9 (Susin et al., 1999a), de la caspase 3 (Mancini et al., 1998) et de la caspase 8 (Qin et al., 2001) sont retrouvées dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie. Ce n'est qu'en présence d'un signal apoptotique que ces protéines précurseur seraient libérées de la mitochondrie vers le cytosol où elles subiraient un clivage pour donner les formes actives. Ainsi, la séquestration des caspases dans la mitochondrie pourrait constituer un mode de régulation de ces protéases en limitant leur activation et en les maintenant éloignées de leurs substrats. D'autre part, les caspases semblent pouvoir migrer du cytoplasme vers le noyau. C'est le cas pour de la caspase 9 qui est présente sous forme active dans le noyau (Susin et al., 1999a). La localisation nucléaire transitoire de la caspase 3 a été également mise en évidence (Krajewska et al., 1997). La découverte d'un signal de localisation nucléaire dans le pro-domaine de la caspase 2 est un argument supplémentaire en faveur d'un rôle potentiel des caspases au niveau du noyau (Baliga et al., 2003).

## **VI. Un dialogue possible entre les deux voies de mort**

L'activation des caspases induite par le cytochrome c cytosolique associé à Apaf-1 ou par les récepteurs de mort ne sont pas des mécanismes totalement indépendants. En effet, l'identification de Bid, un membre de la famille Bcl-2, permet de faire le lien entre les récepteurs de mort et la libération du cytochrome c (**Figure 13**). Bid est un substrat de la caspase 8, activée par la voie des récepteurs de mort. Le fragment C-terminal produit est transféré du cytoplasme vers la mitochondrie (Li et al., 1998a) (Luo et al., 1998). Ce fragment de Bid (tBid) va se dimériser avec la protéine Bax. Ce dimère est alors inséré dans la membrane externe mitochondriale entraînant l'ouverture des mégapores mitochondriaux permettant la libération du cytochrome c (Eskes et al., 2000). Des extraits cytosoliques déplétés en Bid rendent la caspase 8 incapable de libérer, *in vitro*, le cytochrome-c.



**Figure 13 : Un dialogue possible entre la voie extrinsèque des récepteurs de mort et la voie intrinsèque mitochondriale (Couzinet et al 2002).**

La pro-caspase 8 activée par le récepteur de mort Fas va activer une cascade d'autres caspases, notamment les caspases effectrices telles que la caspase 3. La caspase 8 peut déclencher une deuxième voie en clivant la protéine Bid. La forme tronquée de Bid va s'associer avec Bax formant un dimère capable de déclencher la perméabilisation des membranes mitochondriales aboutissant au relargage dans le cytosol du cytochrome-c, de Smac/DIABLO et de AIF. L'apoptosome va pouvoir se former activant ainsi la caspase 9 qui activera à son tour la caspase 3. Smac/DIABLO inactive les IAPs, protéines inhibitrices de l'apoptose. La migration de AIF dans le noyau met en route la fragmentation de la chromatine.

Dans le cas de la signalisation Fas, un lien entre les voies de mort intrinsèques et extrinsèques existe dans certains types cellulaires. En effet, il existe deux types de signalisation en fonction du type cellulaire (Scaffidi et al., 1999). Dans le cas des cellules de type I, une forte activation du DISC est associée à une activation directe de la pro-caspase 8 et des autres effecteurs. Dans les cellules de type II, le niveau de formation du DISC est plus faible, la signalisation requiert une boucle d'amplification supplémentaire mitochondriale qui implique le clivage de Bid par la caspase 8 activée. tBid va engendrer une perméabilisation des membranes mitochondriales et le relargage des protéines apoptogènes.

## **VII. La mort « caspase-indépendante »**

Dans la plupart des cas, l'inhibition des caspases ne bloque pas la mort cellulaire. Par exemple, l'inhibiteur général des caspases zVAD-fmk, s'est avéré incapable d'empêcher la mort cellulaire induite par Bax (Xiang et al., 1996). De nombreux stimuli, comme la privation en sérum (Mills et al., 1998), la surexpression des oncogènes myc et E1A ou de Bak ainsi que les dommages à l'ADN (McCarthy et al., 1997a) sont également capables d'induire une mort cellulaire qui ne peut pas être bloquée par des inhibiteurs de caspases. D'autres travaux montrent que les récepteurs de mort et la protéine RIP peuvent induire une mort cellulaire indépendante des caspases qui s'apparenterait à la nécrose (Chan et al., 2003). Dans les différents cas, les cellules meurent selon un processus proche de la nécrose, sans présenter les modifications nucléaires spécifiques de l'apoptose tels que la fragmentation de l'ADN en fragments de 150 à 200 pb (Mills et al., 1998) (Hirsch et al., 1997) (Monney et al., 1998). Cependant, une fragmentation nucléaire peut avoir lieu au cours de la mort caspase-indépendante mais selon un mécanisme différent que celui observé au cours de l'apoptose. L'inhibition des caspases n'est pas non plus capable de bloquer le bourgeonnement de la membrane plasmique ni la chute du potentiel membranaire mitochondrial (Mills et al., 1998) (McCarthy et al., 1997a).

### Le facteur AIF

Le facteur AIF a été identifié en 1996 par l'équipe de Guido Kroemer et semble responsable de certains aspects de la mort caspase-indépendante (Susin et al., 1996). La protéine AIF est synthétisée sous la forme d'un précurseur de 67 Kda constitué de trois domaines protéiques : la région N-terminale qui contient un domaine de localisation mitochondriale, une séquence centrale et un domaine C-terminal homologue aux oxydoréductases bactériennes. Une fois le

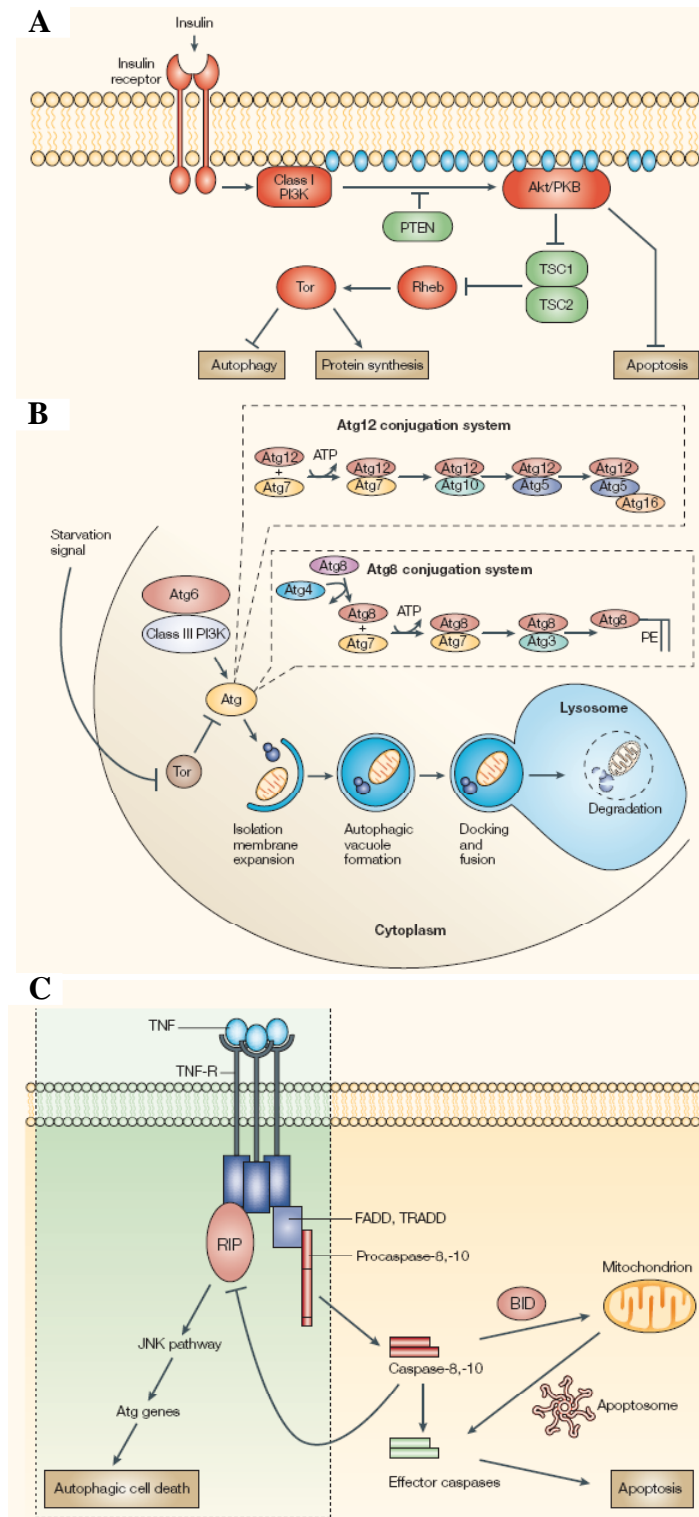
précurseur localisé dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie, il est clivé et libère son domaine N-terminal donnant naissance à la protéine mature : une flavoprotéine de 57 Kda (Ye et al., 2002). Il s'agit d'une molécule possédant une double fonction. C'est à la fois une oxydoréductase et un facteur apoptogène. Après un stimulus de mort, AIF est libérée par la mitochondrie et se relocalise dans le noyau des cellules (Susin et al., 1999b) où elle induit une condensation de la chromatine et un clivage de l'ADN en fragments de hauts poids moléculaires (50 Kb) (Ye et al., 2002). Le mécanisme d'action d'AIF est encore mal connu mais il est proposé que sa liaison à l'ADN pourrait entraîner un changement conformationnel de la chromatine dont la désorganisation aboutirait à des cassures. Ce changement conformationnel pourrait augmenter sa sensibilité aux nucléases et induire, via un mécanisme indépendant des caspases, la dégradation partielle de la chromatine. La voie de mort AIF est indépendante des caspases et ne nécessite aucun intermédiaire pour provoquer l'apoptose nucléaire et pourrait donc intervenir dans la voie apoptotique indépendante des caspases.

#### Ⓢ L'autophagie

L'autophagie a souvent été mentionnée pour expliquer la destruction de la cellule en absence de l'activité des caspases. L'autophagie est une voie majeure du catabolisme lysosomal qui permet la dégradation de macromolécules et d'organites cellulaires chez les eucaryotes. Une implication importante de l'autophagie est observée au cours du développement, du vieillissement de la cellule, dans des processus pathologiques comme le cancer, les maladies neurodégénératives et certaines formes de myopathies. Ces observations ont suggéré que ce phénomène pourrait jouer un rôle actif dans la mort cellulaire.

Le rôle physiologique et le contrôle génétique de l'autophagie ont été bien caractérisés chez la levure, organisme chez lequel l'autophagie joue un rôle majeur dans l'adaptation à des carences nutritionnelles prolongées en permettant le catabolisme des composants intracellulaires et l'élimination des organites endommagés afin d'assurer la survie cellulaire (Codogno and Meijer, 2005). L'autophagie a pour fonction primaire de réguler le recyclage des protéines à durée de vie longue et des organelles cellulaires. Ce processus est caractérisé par la formation de vacuoles appelées autophagosomes qui isolent le matériel cellulaire à dégrader. Les autophagosomes fusionnent avec les lysosomes pour former des autophagolysosomes qui sont les compartiments terminaux de la dégradation (**Figure 14 B**) (Marino and Lopez-Otin, 2004). L'autophagie est un mécanisme hautement régulé dépendant des gènes ATG (autophagy-related genes) (pour revue (Klionsky et al., 2003) (Levine and





**Figure 14 : Les différentes étapes d'activation de l'autophagie (d'après Baehrecke et al, 2005).**

A. L'autophagie est stimulée par divers signaux qui sont transduits le long de voies de signalisations dont la voie PI3K de type I/PKB/mTOR pour aboutir à la formation de la membrane autophagosomale.

B. La formation de l'autophagosome est dépendant de deux systèmes de conjugaison « ubiquitin-like » utilisant les protéines Atg. La phosphatidylinositol 3-phosphate kinase (PI3K) de classe III est localisée probablement sur la membrane du réseau trans-golgien où elle interagit avec la protéine bécline 1 (Atg6) participant aux phases précoces de la formation des vacuoles autophagiques. Après fusion avec des endosomes (précoces et/ou tardifs), le matériel séquestré dans l'autophagosome est digéré dans le lysosome.

C. Un lien entre les récepteurs de mort et l'autophagie.

Klionsky, 2004) (Wang and Klionsky, 2003). Une quinzaine de protéines Atg, pour la plupart conservées de la levure à l'homme, sont nécessaires à sa biogenèse. Elles sont recrutées dans le cytoplasme et s'associent de façon transitoire avec la membrane pré-autophagosomale et à celle de l'autophagosome. L'autophagosome est délimité par plusieurs feuillettes lipidiques (en général quatre) dont l'origine est encore mal connue. Plusieurs compartiments cellulaires (réticulum endoplasmique, appareil de Golgi et réseau trans-golgien) et la membrane plasmique concourraient à la formation de l'autophagosome.

La formation de l'autophagosome repose essentiellement sur deux systèmes de conjugaison appelés « ubiquitin-like » puisque leur principe de fonctionnement est similaire à celui de l'ubiquitination des protéines dans la voie du protéasome. Ces deux systèmes utilisent les protéines Atg (**Figure 14 B**) (Klionsky et al., 2003) et permet la conjugaison d'Atg8 et de la phosphatidyléthanolamine sur la membrane pré-autophagosomale. La kinase Tor est considérée comme le « gardien » de l'autophagie en agissant comme un détecteur du niveau d'acides aminés et d'ATP. Lors d'une carence nutritive, Tor est inhibée, l'autophagie est déclenchée et l'expression d'Atg8 est augmentée (Kirisako et al., 1999) (**Figure 14 A**). La phosphatidylinositol 3-kinase de classe III (classe III PI3K) est elle impliquée dans les phases précoces de la formation des vacuoles et contrôle la voie autophagique en s'associant avec la protéine Atg6 au niveau du réseau trans-golgien (**Figure 14 A-B**) (Kihara et al., 2001) (Pattingre and Levine, 2006).

Chez les mammifères, l'autophagie aurait un rôle complexe permettant à la fois la survie cellulaire au cours de carences nutritionnelles et la mort des cellules endommagées ou carencées en facteurs de survie (Levine and Klionsky, 2004) (Petiot et al., 2002) (Codogno and Meijer, 2005). De façon intéressante, de plus en plus de travaux montrent que l'autophagie et l'apoptose sont des processus étroitement liés (pour revue (Baehrecke, 2005)). En effet, l'autophagie peut inhiber ou au contraire être nécessaire à l'induction de l'apoptose. De plus, l'inhibition des caspases entraîne souvent une augmentation massive de l'autophagie. Un lien moléculaire entre ces deux processus a été démontré par la découverte d'une interaction directe entre la protéine Beclin 1, qui est l'homologue mammifère de la protéine Atg6, et la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Cette relation moléculaire entre acteurs de l'apoptose et mort autophagique a été soulignée par le fait que l'inhibition de l'activité basale de certaines caspases, notamment de la caspase 8 entraîne la cellule vers une mort autophagique interrompue par l'invalidation de l'expression des gènes Atg7 et beclin 1 (Yu et

al., 2004). Une nouvelle signalisation moléculaire a été identifiée dans laquelle l'autophagie peut être induite, via les récepteurs de mort, par l'activation de la protéine RIP et des JNK (**Figure 14 C**).

## **Chapitre 2. La mort cellulaire programmée neuronale dans l'embryon de poulet**

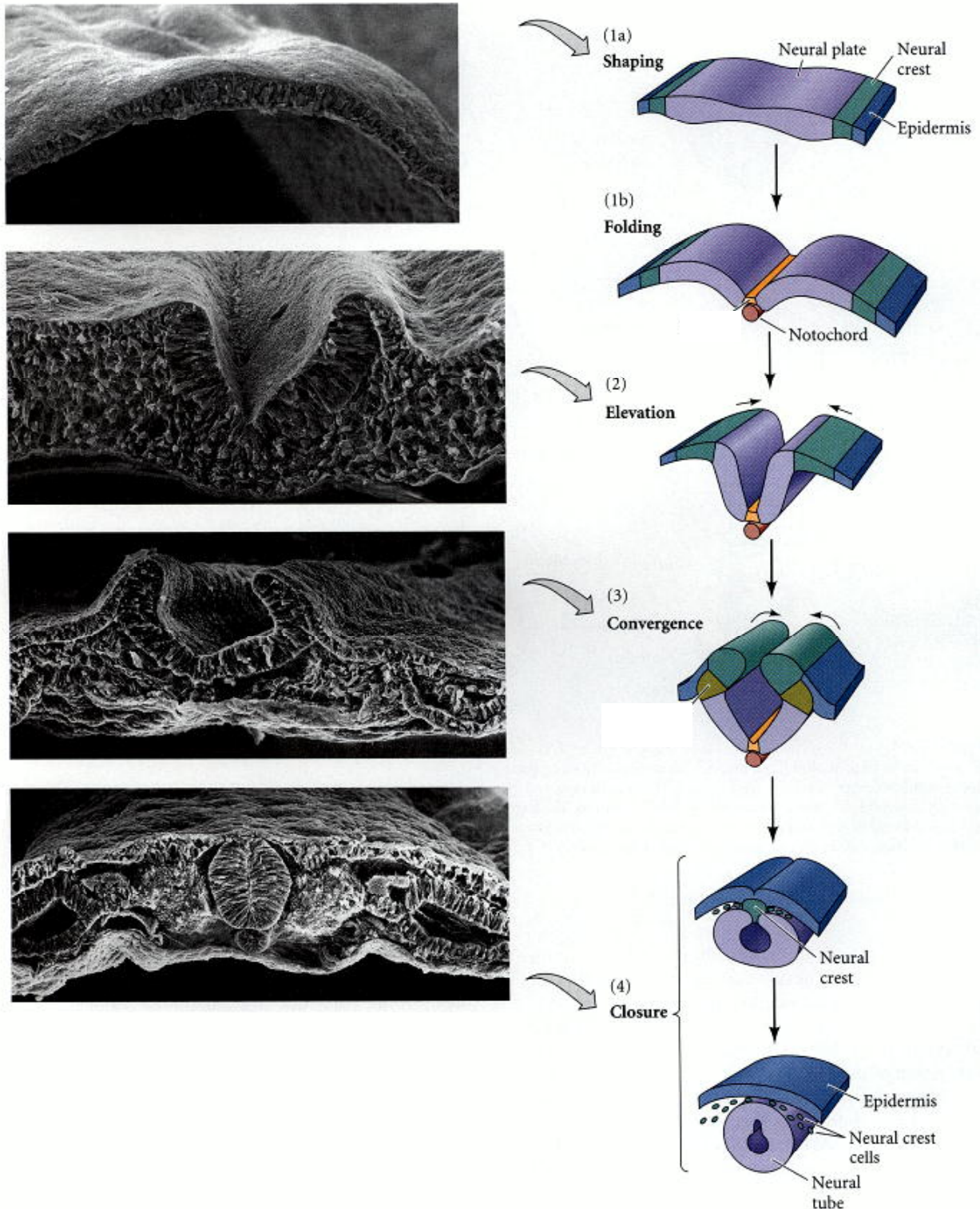
On peut diviser le développement du système nerveux en quatre phases essentielles : la spécification de l'identité des cellules neurales (comme neurone ou cellule gliale), la migration des neurones et l'allongement de leurs axones vers les cellules cibles (neurones, fibres musculaires ou cellules glandulaires), la formation de synapse et enfin la mort programmée d'une partie de ces cellules neuronales.

### **I. Les motoneurones : origine, localisation et différenciation au cours du développement embryonnaire du poulet**

#### **I.1 Les premières étapes du développement embryonnaire du système nerveux**

Le système nerveux embryonnaire apparaît très tôt au cours du développement avant la 20<sup>ème</sup> heures de développement chez l'embryon de poulet. Préalablement au développement du système nerveux, l'embryon se compose de trois feuillets : l'ectoderme qui donnera l'épiderme et le système nerveux, le mésoderme qui donnera les muscles, le squelette et les tissus conjonctifs et l'endoderme qui donnera la couche interne des viscères. Le tissu nerveux apparaît à la suite d'envoi de signaux moléculaires du mésoderme vers l'ectoderme. Ce phénomène, appelé l'induction neurale, se traduit par la transformation d'une partie de l'ectoderme en tissu nerveux primitif : la plaque neurale ou neurectoderme. La période pendant laquelle se forme et s'organise le neurectoderme sur la face dorsale de l'embryon correspond à la neurulation (**Figure 15**).

Le neurectoderme va ensuite évoluer en 4 étapes (**Figure 15**) pour former les ébauches des systèmes nerveux périphériques et centraux. Cette évolution commence dans la partie se fait toujours d'abord du côté antérieur et progresse vers le pôle postérieur de l'embryon. La différenciation du tissu nerveux primitif est précoce au niveau de la tête (partie rostrale) et plus tardive dans la partie caudale. Lors de son induction, le neurectoderme s'épaissit par rapport au reste de l'ectoderme pour former la plaque neurale qui est marquée en son centre par un sillon neural qui suit l'axe longitudinal de l'embryon. La plaque neurale s'invagine de manière à former la gouttière neurale. Les bords dorsaux de la gouttière appelés les bourrelets neuraux se rejoignent et les cellules prolifèrent. La fermeture de la gouttière s'accompagne de l'isolement de groupes de cellules, les crêtes neurales, dans la partie dorsale du tube neural



**Figure 15 : Formation du tube neural chez l'embryon de poulet (Smith and Schoenwolf, 1997).**

L'ectoderme médio-dorsal épaissi en plaque neurale va s'invaginer en une gouttière provoquant la formation et l'élévation de replis neuronaux. La fusion de ces replis neuronaux sera à l'origine du tube neural. Une fois formé le tube neural se détache de l'ectoderme. Les crêtes neurales proviennent de la bordure de la plaque neurale. A la fermeture du tube neural, elles quittent la couche épithéliale pour migrer vers différentes régions de l'embryon où elles donneront naissance à différents types cellulaires (neurones, cellules pigmentaires, cellules musculaires, cellules glandulaires...).

primaire correspondant aux bourrelets neuraux. Le tissu nerveux est constitué d'un tube dorsal délimité par un neuroépithélium pseudo-stratifié recouvert par l'ectoderme. Une fois complètement fermé, le tube neural s'épaissit par prolifération des cellules neuroépithéliales et délimite une cavité qui donnera les ventricules encéphaliques et le canal de l'épendyme. Après une prolifération intense à proximité de la lumière du tube, les cellules deviennent post-mitotiques. On définit ainsi la naissance d'un neurone à sa dernière division mitotique. Les progéniteurs vont alors migrer vers la partie la plus externe du tube nerveux. Les premières cellules produites sont des neurones. La production des cellules gliales est plus tardive et celles-ci ne sont pas définitivement post-mitotiques contrairement aux neurones. Leur prolifération s'observe dans tout le système nerveux en formation. Les cellules des crêtes neurales, quant à elles, migrent pour former les divers éléments du système nerveux périphérique, comportant les nerfs, les ganglions rachidiens ainsi que les ganglions du système nerveux autonome. Dans la partie céphalique, certaines crêtes neurales constituent du mésoderme qui formera une grande partie du squelette et du tissu conjonctif de la face du crâne et du cou (**Figure 15**). Les crêtes neurales sont également à l'origine de cellules pigmentaires et de la médullo-surrénale.

## **I.2 Localisation et acquisition de l'identité propre de chaque pool de motoneurones situés dans le tube neural**

### **a) Localisation des neurones dans la moelle épinière**

Il existe une organisation dorso-ventrale particulière de la moelle épinière en développement (Tanabe and Jessell, 1996) (**Figure 16 A**). Les somas des neurones sont localisés dans la substance grise médullaire. On distingue trois catégories de neurones dans la moelle épinière (Altman and Bayer, 1984) :

(1) Les fibres nerveuses des neurones qui relaient l'information sensorielle depuis la périphérie (muscles, peau, viscères) jusqu'au cerveau.

(2) Les fibres nerveuses des neurones qui relaient l'information motrice depuis le cerveau jusqu'aux motoneurones.

(3) Des neurones propres à la moelle épinière parmi lesquels on trouve entre autres des interneurones segmentaires, des interneurones propriospinaux qui relient différents segments entre eux, des interneurones commissuraux impliqués dans la coordination droite-gauche. Les

motoneurones ont leur stroma situé dans la moelle épinière et leur axone contenu dans les nerfs périphériques. Chaque motoneurone projette sur un certain nombre de fibres musculaires. Les neurones moteurs sont situés ventralement dans le tube neural en cours de différenciation.

## **b) La naissance et différenciation des motoneurones**

### *La naissance des motoneurones*

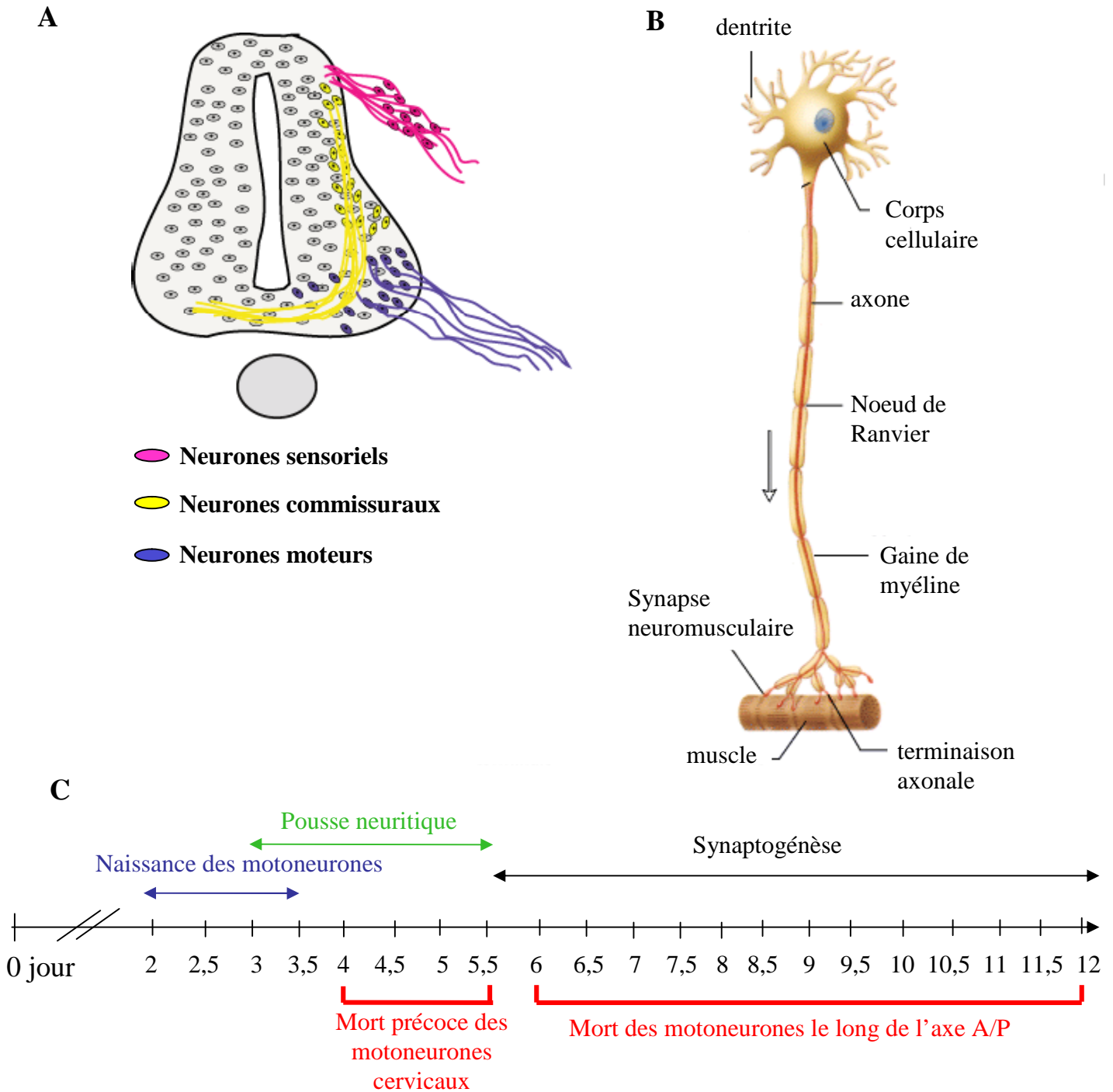
L'autoradiographie à la thymidine tritiée a permis de déterminer le mode de prolifération des cellules situées dans le tube neural (Bayer et al., 1994). La division cellulaire se fait au contact de la lumière du tube neural donnant naissance à deux cellules filles tandis que la réplication de l'ADN se déroule dans un noyau localisé à la périphérie de ce tube. Les cellules neuro-épithéliales souches sont initialement pluripotentes et donnent naissance aux neuroblastes qui donneront l'ensemble des neurones du système nerveux central et aux glioblastes qui donneront les cellules gliales. Dans la moelle épinière embryonnaire, les neuroblastes de la moitié ventrale du tube neural donneront les neurones moteurs.

Pour notre part, nous nous intéresserons tout particulièrement aux motoneurones chez l'embryon de poulet qui sont générés, dans le tube neural, dès le deuxième jour de développement (Gould et al., 1999) (**Figure 16 B-C**).

### *Différenciation des motoneurones*

Les travaux du groupe du Dr Thomas Jessell ont permis de disséquer les mécanismes impliqués dans la différenciation des neurones de la moelle épinière (pour revue (Tanabe and Jessell, 1996) (Shirasaki and Pfaff, 2002) (Lee and Pfaff, 2001)). La différenciation des cellules progénitrices situées dans le tube neural est contrôlée par des signaux inducteurs sécrétés par les tissus environnants qui diffusent depuis leur source de production et forment un gradient de concentration. Des concentrations spécifiques du signal inducteur entraînent l'expression de facteurs de transcription spécifiques formant un réseau complexe agissant de manière séquentielle et déterminant au final les caractéristiques phénotypiques d'un type neuronal donné.

La formation des motoneurones est contrôlée par des signaux inducteurs provenant de la corde. Ceci a été démontré par des expériences d'ablation et de greffe de corde chez



**Figure 16 : Vie et mort des motoneurone au cours du développement embryonnaire chez l'embryon de poulet.**

A. Dès le 2<sup>ème</sup> jour du développement embryonnaire, la formation des motoneurones commence au sein du tube neural. Un jour plus tard les axones des motoneurones commencent à projeter vers la périphérie : c'est l'extension axonale. Les neurones sensoriels proviennent des crêtes neurales et leurs corps cellulaires forment les ganglions rachidiens dorsaux.

B. Connexion d'un motoneurone au muscle.

C. Représentation temporelle de la vie d'un motoneurone chez l'embryon de poulet depuis sa naissance jusqu'à la formation de la jonction neuro-musculaire. Plus de la moitié des motoneurones depuis la région cervicale jusqu'à la région caudale meurent naturellement durant la synaptogénèse. Les motoneurones cervicaux sont également touchés préalablement par une mort plus précoce.



l'embryon de poulet. Lorsqu'une partie de la corde est enlevée, les motoneurones ne se différencient plus. En revanche, la greffe d'une deuxième corde en position dorsale induit le développement de motoneurones ectopiques dans la moitié dorsale du tube neural. Il a été montré que les propriétés inductives de la corde sont dues à une protéine sécrétée appelée Sonic Hedgehog (Shh) (Roelink et al., 1994). Shh est produite initialement seulement par la corde puis par la corde et la plaque du plancher du tube neural après sa fermeture (Roelink et al., 1994) (Roelink et al., 1995). Cette protéine induit la ventralisation du tube neural en reprimant l'expression ventrale des gènes impliqués dans la dorsalisation du tube neural tels que PAX3, PAX7, MSX1 et MSX2. Shh induit également l'expression de gènes spécifiques de groupes cellulaires ventraux (Ericson et al., 1996) (Ericson et al., 1997). Shh s'exprime selon un gradient de concentration. Les concentrations les plus fortes de Shh sont atteintes à proximité de la corde permettant d'induire la différenciation des cellules du plancher. La région ventrale du tube neural reçoit des concentrations intermédiaires de Shh assurant la différenciation des motoneurones. La région intermédiaire du tube neural, plus éloignée de la corde, ne reçoit que de faibles concentrations induisant la différenciation des interneurones ventraux (Roelink et al., 1995) (Ericson et al., 1997). Ce rôle ventralisant de Shh a été confirmé par l'analyse des souris *Shh*<sup>-/-</sup> chez lesquelles les populations ventrales du tube neural sont absentes (Chiang et al., 1996).

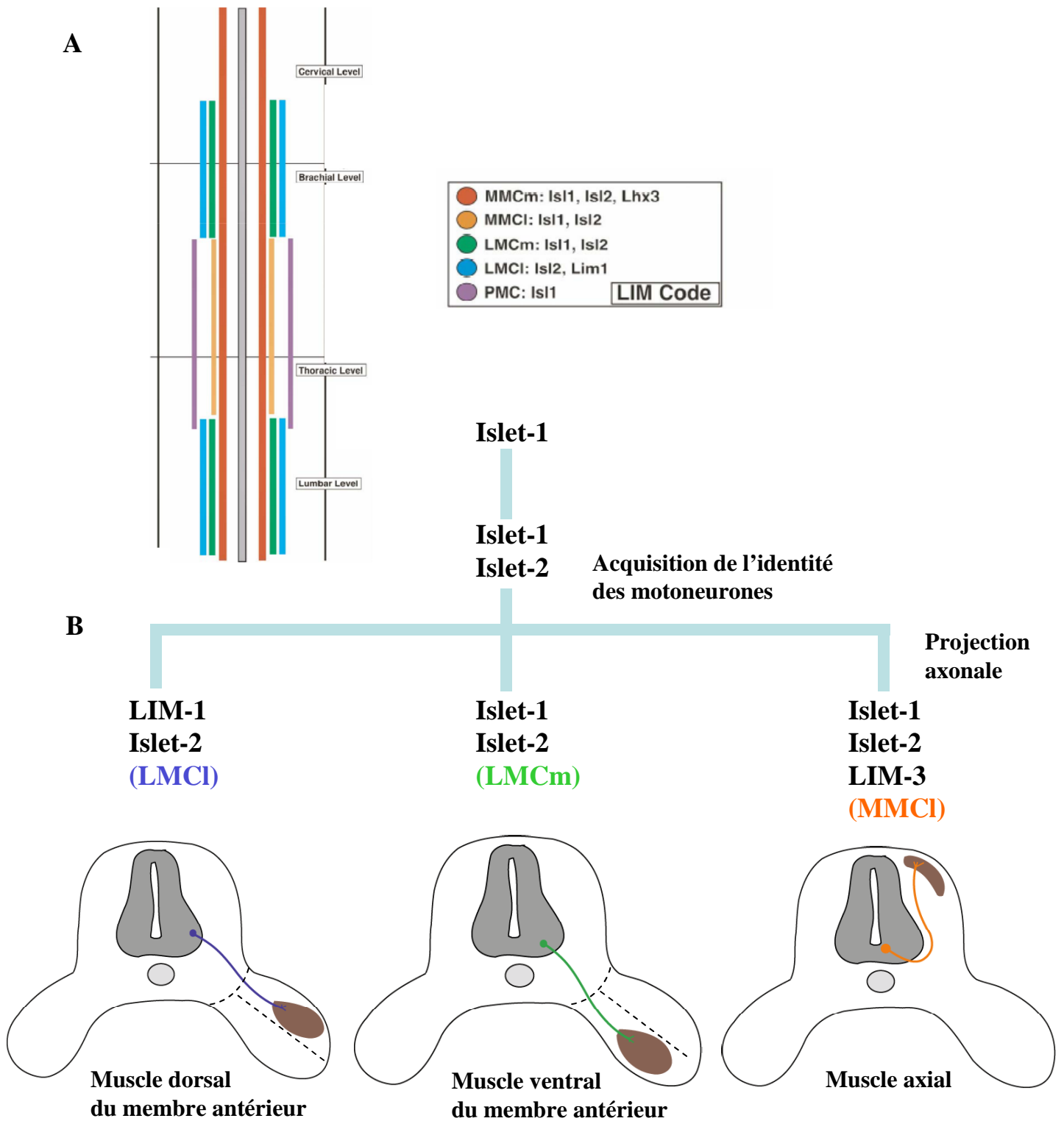
*Chaque pool de motoneurones acquièrent sa propre identité : la famille des gènes LIM*

Les motoneurones se localisent dans la partie ventrale de la moelle épinière selon une organisation spatiale très précise qui peut être définie selon trois axes, dorso-ventral, rostro-caudal et médio-latéral. On peut distinguer deux types de motoneurones : les motoneurones viscéraux innervant les ganglions du système sympathique et les motoneurones somatiques innervant les muscles squelettiques. Nous nous intéresserons uniquement à ce dernier groupe de motoneurones. Ils sont organisés en deux colonnes longitudinales : la colonne motrice médiane (MMC) et la colonne motrice latérale (LMC), chacune subdivisée en une partie médiane (m) et une partie latérale (l) (**Figure 17 A**) (Shirasaki and Pfaff, 2002). Les motoneurones de la MMC médiane (MMCm) s'étendent tout le long de l'axe rostro-caudal et innervent les muscles axiaux du dos. Ceux de la MMC latérale (MMC<sub>l</sub>), situés au niveau thoracique, innervent les muscles de la paroi du corps. La colonne motrice latérale se trouve aux niveaux brachial et lombaire. Les motoneurones de la LMC médiane (LMCm) innervent les muscles ventraux des membres et ceux de la LMC latérale (LMC<sub>l</sub>) innervent les muscles

dorsaux des membres (**Figure 17 B**) (Shirasaki and Pfaff, 2002). On peut donc classer les neurones moteurs de la moelle épinière en fonction de la position des corps cellulaires au sein du tube neural mais également en fonction des muscles qu'ils innervent (Lance-Jones and Landmesser, 1981) (Tosney et al., 1995). Peu après leur sortie du cycle cellulaire, les motoneurones post-mitotiques commencent à exprimer les facteurs de transcription à homéodomaine de la famille LIM. Chaque sous-type de motoneurones chez l'embryon de poulet présente une combinaison de protéines codées par les gènes à homéoboîte de la famille LIM qui permettent d'apporter aux neurones une identité de position et permettent à leurs axones de choisir un trajet donné (Lumsden, 1995). Les cinq gènes (Islet-1, Islet-2, Lim-1, Lim-3 et Lhx3), codant pour des facteurs de transcription à homéodomaine, ont été clonés par homologie chez l'embryon de poulet. Chacune de ces protéines a un profil d'expression spécifique le long de l'axe antéro-postérieur de la moelle épinière. Les motoneurones d'une colonne motrice peuvent être identifiés par l'expression d'une combinaison spécifique des gènes de la famille LIM. Les motoneurones acquièrent ainsi une identité de région le long de l'axe antéro-postérieure. Si on transplante une partie de la moelle épinière d'une zone adjacente à un membre vers la région thoracique, on constate que l'expression des LIM se fait en accord avec le nouveau site. Les signaux qui déterminent l'expression de ces gènes pourraient être émis par le mésoderme adjacent (Shirasaki and Pfaff, 2002).

#### *La croissance et la fasciculation des motoneurones*

Chaque sous-type de motoneurones exprime une combinaison des gènes LIM leur apportant une identité de position et permet aux axones de choisir un trajet donné. La croissance axonale des motoneurones vers la cible appropriée dépend de l'expression de molécules leur permettant de répondre spécifiquement à des signaux de guidage extrinsèques. Des motoneurones déplacés le long de l'axe antéro-postérieur par rotation d'une partie du tube neural, sont capables de modifier leur trajectoire pour envoyer leurs axones vers leurs cibles, quitte à pénétrer dans le membre en position anormale (Landmesser, 2001). De façon similaire la rotation des bourgeons des membres montre que les cônes de croissance des motoneurones répondent à des signaux de guidage (Landmesser, 2001). Quand les motoneurones sont déplacés sur des distances relativement grandes, leurs axones vont le plus souvent se diriger vers leurs cibles appropriées. Il existe donc des signaux produits par les membres auxquels les motoneurones peuvent répondre différemment. Ces signaux sont soit attractifs soit répulsifs.



**Figure 17 : Organisation des neurones au cours du développement du tube neurale chez l'embryon de poulet.**

A. Les motoneurones sont organisés en deux colonnes longitudinales : la colonne motrice médiane (MMC) et la colonne motrice latérale (LMC), chacune subdivisée en partie médiane (m) et latérale (l). PMC : colonne motrice intermédiaire. Les motoneurones post-mitotiques commencent à exprimer les facteurs de transcription de la famille des LIM.

B. Au départ tous les motoneurones expriment Islet-1 et Islet-2, deux des protéines de la famille LIM. Au moment de l'expansion axonale, les motoneurones innervant les différentes régions musculaires expriment diverses combinaisons des protéines Islet-1, Islet-2, LIM-1 et LIM-3, ici spécifique de la région de la future aile.

*La jonction neuro-musculaire*

L'innervation des muscles au niveau du membre se fait suivant un plan précis. Chez l'embryon, les axones des motoneurones qui arrivent dans le membre en formation établissent très précocement leurs connexions avec les muscles cibles. Par exemple, chez l'embryon de poulet ces connexions motoneurone-muscle débutent dès le 5,5<sup>ème</sup> jour embryonnaire dans la région la plus antérieure pour se terminer vers le 12<sup>ème</sup> jour embryonnaire dans la partie la plus caudale de l'embryon (**Figure 16 B-C**). A leur arrivée à la base du membre, les axones issus du tube neural sont groupés en un faisceau unique suite à leur fasciculation. Les extrémités axonales de chacun des motoneurones se séparent les unes des autres pour connecter de façon individuelle une fibre musculaire et y former une plaque motrice. Après que les axones des neurones moteurs atteignent leur cible musculaire, la mort cellulaire programmée se déclenche pour une partie d'entre eux (**Figure 16 C**).

## **II. Caractérisation de la mort naturelle des motoneurones**

### **II.1 Mise en évidence spatio-temporelle de la mort physiologique des motoneurones au cours de l'établissement de la jonction neuro-musculaire**

Ce sont les travaux d'embryologie expérimentale de L. Shorey au début du siècle, repris par V. Hamburger dans les années 1930 (Hamburger et al, 1934) et par R. Levi-Montalcini dans les années 1940 qui ont permis de découvrir la mort naturelle et physiologique des motoneurones au cours du développement embryonnaire.

Deux expériences (**Figure 18**), chez l'embryon de poulet indiquent le rôle clé des muscles cibles dans la mort naturelle des motoneurones :

- ⊕ L'ablation chirurgicale de l'ébauche du membre de la patte chez l'embryon de poulet (Hamburger, 1975) (**Figure 18 A, B, E**)

L'excision de l'ébauche du membre est réalisée à un stade précoce, entre le 2<sup>ème</sup> et le 3<sup>ème</sup> jour de développement embryonnaire, avant même que les axones des motoneurones n'aient contacté leur cibles musculaires. Hamburger a pu observer, au bout de quelques jours, une hypoplasie de la colonne motrice et des ganglions rachidiens innervant le muscle excisé due à une diminution du nombre de motoneurones dans la colonne motrice latérale. La taille de la

corne ventrale semblait dépendre de la qualité de l'exérese expérimentale et à la quantité de membre restant laissé en place.

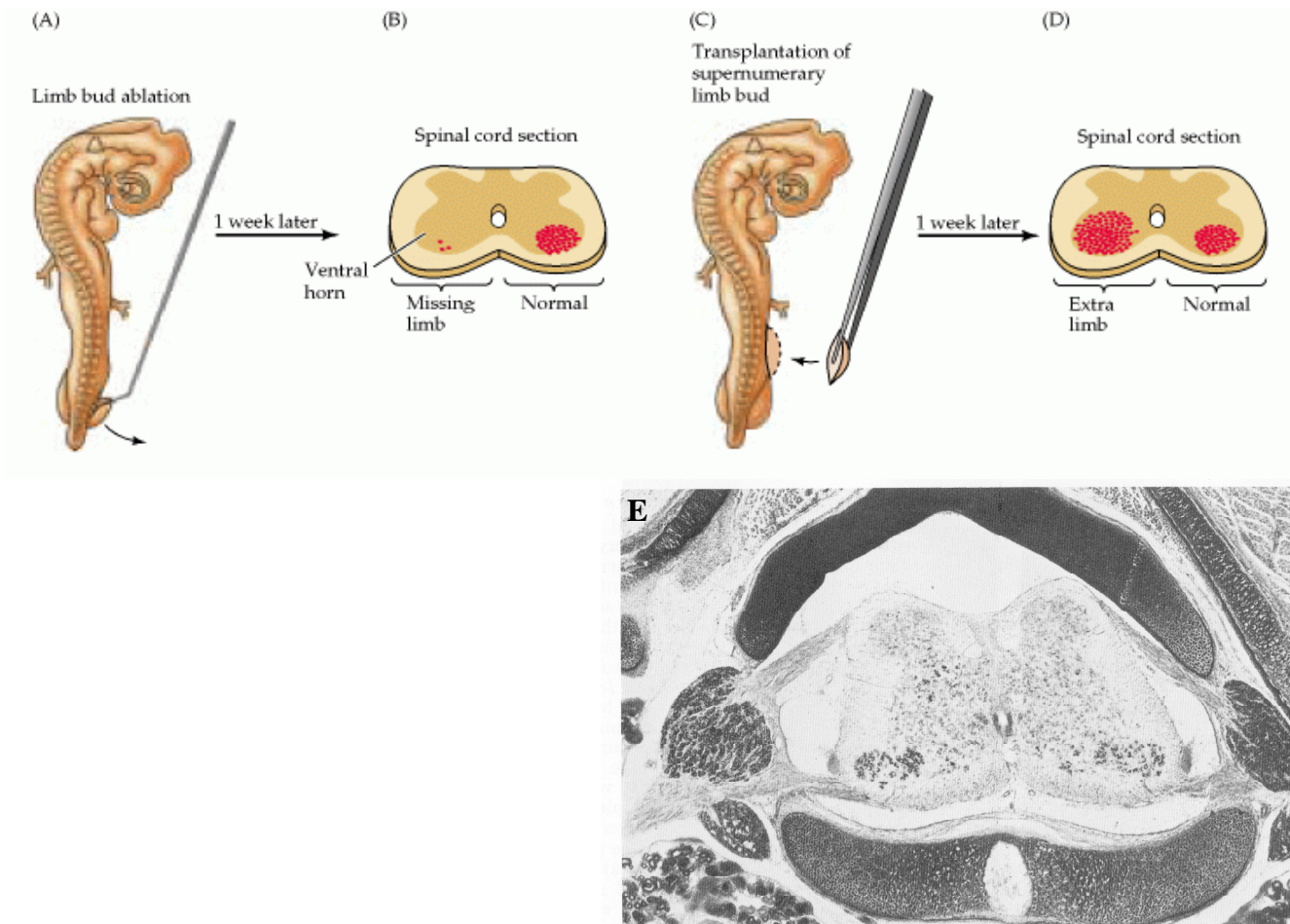
⊗ La greffe d'un bourgeon supplémentaire au même niveau que la patte (Hollyday and Hamburger, 1976) (**Figure 18 C-D**)

La greffe d'un membre surnuméraire apportant des cibles surnuméraires pour les axones, augmente significativement le nombre de neurones moteurs survivant et conduit à une hyperplasie de la corne ventrale et des ganglions rachidiens.

En 1942, R. Levi-Montalcini observa que l'ablation de membre n'affectait ni le nombre de motoneurones initialement formé dans le tube neural ni leur différenciation (Levi-Montalcini R. et al, 1942). Elle proposa l'hypothèse, selon laquelle, les muscles périphériques seraient nécessaires à la survie de ces motoneurones déjà différenciés et non pas à leur développement.

Ce concept de mort neuronale induite par l'ablation du membre fut confirmé pour les neurones des ganglions rachidiens qui ont été souvent choisis comme modèle d'étude à la place des motoneurones. Ces expériences ont permis de montrer l'existence d'une mort cellulaire de neurones sensoriels au niveau des segments adjacents thoraciques et cervicaux non concernés par l'opération. Cette mort naturelle embryonnaire physiologique sans intervention chirurgicale a été observée dans d'autres populations de neurones dont les motoneurones (Oppenheim, 1991). Le terme de « mort neuronale programmée » a été choisi pour rendre compte du caractère stéréotypé de cette mort cellulaire touchant la même population de neurones au même moment de l'embryogenèse, en général peu après que les neurones contactent leurs cibles.

Le développement des voies neuronales se fait initialement sous la gouverne de mécanismes génétiquement programmés. Cependant, ces mécanismes intrinsèques ne peuvent former que des circuits esquissés grossièrement faits d'une multitude de synapses extrêmement redondantes. Un processus de sélection est donc nécessaire pour diminuer le nombre ces synapses et raffiner les circuits nerveux. Aux premiers stades du développement, une fibre musculaire peut être innervée par des terminaisons nerveuses issues de plusieurs motoneurones. Avec le temps, la plupart de ces connexions seront éliminées jusqu'à ce que la fibre soit innervée par les terminaisons d'un seul motoneurone. C'est l'activité électrique de la jonction neuromusculaire qui régule ce processus de sélection. Par exemple, si la transmission synaptique au niveau de la jonction neuromusculaire est bloquée avec un antagoniste comme



**Figure 18 : Effets de l’ablation ou de l’augmentation des cibles musculaires sur la survie des motoneurones (tiré du livre Neurosciences, édition DeBoeck; d’après (Hamburger 1958 et 1977) et (Holliday et Hamburger, 1976) .**

A-B. L’amputation du bourgeon du membre postérieur d’un embryon de poulet à 2,5 jours de développement réduit fortement le nombre de motoneurones qui aurait dû innerver les muscles de l’extrémité manquante. Les motoneurones, dont les corps cellulaires sont situés dans la partie ventrale du tube neural, dégèrent presque complètement après l’amputation de ce membre tandis que le côté opposé présente un effectif normal de motoneurones.

C-E. La greffe d’un bourgeon de membre supplémentaire à 2,5 jours de développement préserve les motoneurones de leur mort programmée. Du côté où a été placé le greffon, on observe un nombre anormalement élevé de motoneurones ainsi qu’une augmentation de la taille des ganglions spinaux.

le curare, l'innervation polyneuronal persiste. De même, si l'émission de potentiels d'action des motoneurones est bloquée avec un bloqueur de canaux sodiques, la réduction de l'innervation n'a pas lieu.

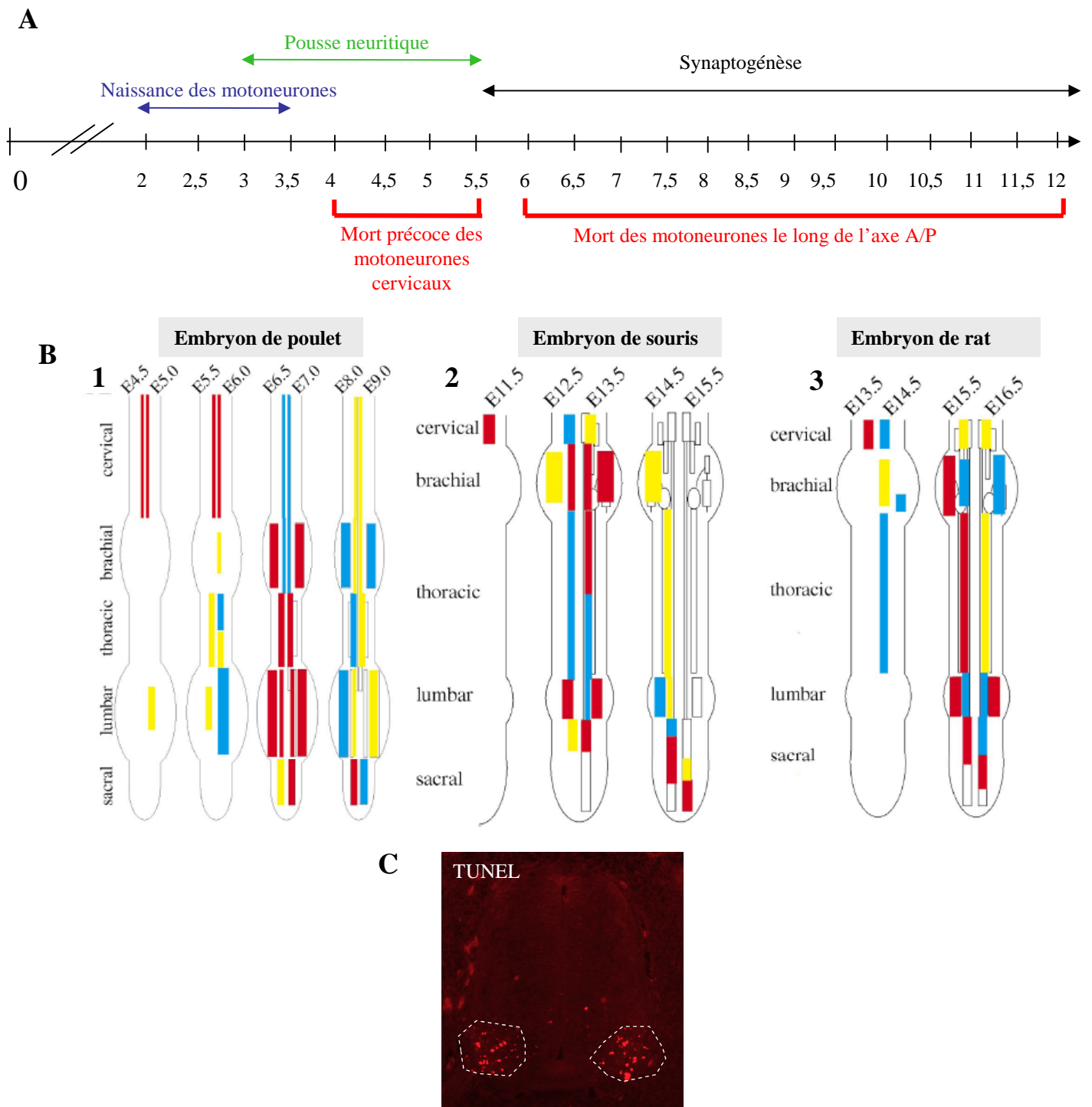
La mort naturelle des motoneurones a été particulièrement bien étudiée chez l'embryon de poulet mais elle existe dans toutes les espèces (pour revue (Hamburger, 1992) (Oppenheim, 1991)). Plus de 55% des motoneurones meurent entre le 6<sup>ème</sup> et le 12<sup>ème</sup> jour embryonnaire chez le poulet ((Hollyday and Hamburger, 1976) (Hollyday et al., 1977) (Oppenheim et al., 1978) (Homma et al., 1994)). Les travaux de Yamamoto (Yamamoto and Henderson, 1999) ont permis d'établir très précisément une échelle spatio-temporelle de la mort programmée des motoneurones chez l'embryon de poulet, de souris et de rat par marquage au TUNEL (dUTP Nick End Labelling) de moelle épinière « *in toto* » (**Figure 19 B**). Dans la région cervicale du tube neural, il existe deux vagues de mort qui aboutissent à la perte de 85% des motoneurones (Yaginuma et al., 1996):

(1) Une mort précoce indépendante de l'établissement d'un contact avec la cible musculaire a lieu dans la région cervicale de toutes les espèces et entraîne la perte de 25 à 30% des motoneurones. Cette mort précède l'établissement du contact entre les motoneurones et leurs cibles musculaires.

(2) Une mort dépendante de la cible musculaire se déroule juste après la fin de la mort précoce. Au niveau brachial, la mort cellulaire concerne 50% des motoneurones en une seule phase plus lente entre le 6<sup>ème</sup> et le 8<sup>ème</sup> jour de développement embryonnaire. En général, au niveau brachial et lombaire, le pic de mort des motoneurones suit de 24 heures environ l'établissement des premières plaques motrices enregistrables.

## **II.2 La survie des motoneurones dépend d'une compétition pour les facteurs extrinsèques : les neurotrophines**

Les travaux de Hamburger et de Levi-Montalcini ont suggéré que la survie des neurones spinaux (motoneurones et neurones sensoriels) dépendait de facteurs neurotrophiques produits en quantité limitée par les muscles cibles situés dans les membres. Le NGF (Nerve Growth Factor) a été le premier facteur identifié indispensable à la survie des motoneurones (Cohen et



**Figure 19 : Vie et mort des motoneurone au cours du développement embryonnaire.**

A. Représentation temporelle de la vie d'un motoneurone chez l'embryon de poulet depuis sa naissance jusqu'à la formation de la jonction neuro-musculaire. Plus de la moitié des motoneurones depuis la région cervicale jusqu'à la région caudale meurent naturellement durant la synaptogénèse. Les motoneurones cervicaux sont également touchés préalablement par une mort plus précoce.

B. Représentation spatio-temporelle de la période de mort naturelle des motoneurones déterminés par TUNEL durant le développement embryonnaire du poulet (1), de la souris (2) et du rat (3). Les couleurs différencient les régions à forte (rouge), moyenne (bleue) ou faible (jaune) intensité de mort neuronale (d'après Yamamoto et al 1999).

C. Coupe transversale d'un tube neural dans la région cervicale d'un embryon de poulet à 4,5 jours de développement. Les noyaux des motoneurones en train de mourir dans la région ventrale du tube neural sont marqués par le TUNEL.



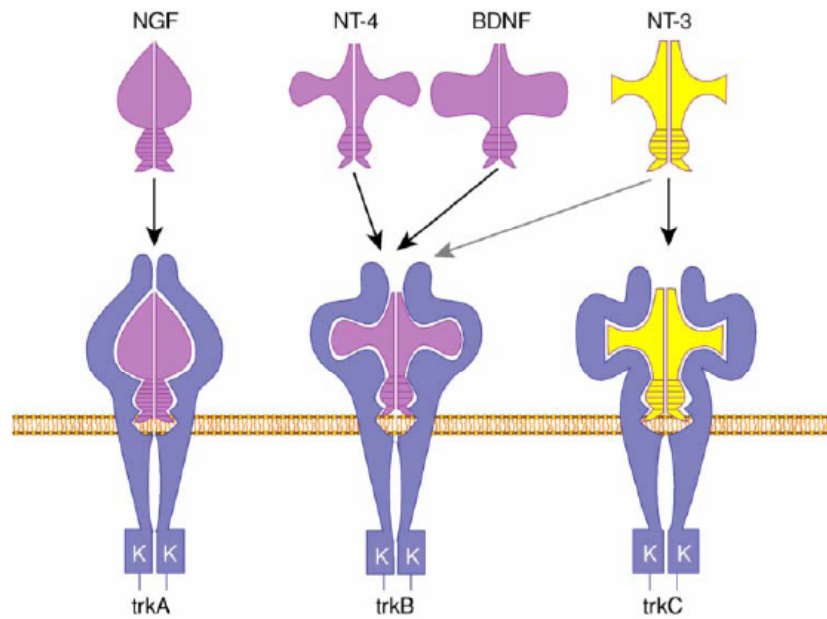
al., 1954) (Levi-Montalcini et al., 1954) (Levi-Montalcini and Hamburger, 1951) (Hamburger et al., 1981).

Le NGF administré de façon exogène augmente la survie des neurones spinaux *in vivo* et *in vitro* stimulant également la croissance neuritique et la production de neurotransmetteurs. A l'inverse, la déplétion du NGF endogène, par l'utilisation d'anticorps bloquants, entraîne la mort de la quasi-totalité de ces neurones. Il a été montré pour les neurones sensitifs que la concentration en NGF dans les tissus cibles était limitante au moment de la période de mort neuronale (Davies et al., 1987).

Oppenheim, en 1996, a défini les caractéristiques nécessaires à la définition d'un facteur neurotrophique (Oppenheim, 1996) qui doit:

1. être produit au niveau du muscle pendant la période de mort programmée
2. être produit en quantité limitante pour que les motoneurones devant survivre soient sélectionnés par compétition
3. être sécrété par les cellules cibles et interagir avec un récepteur spécifique présent au niveau des terminaisons nerveuses
4. être internalisé, transporté de façon rétrograde et activer une cascade de transduction de signal assurant la survie neuronale
5. permettre la survie de cultures de motoneurones à une concentration proche des concentrations physiologiques
6. empêcher la mort *in vivo* des motoneurones après un ajout exogène
7. la réduction expérimentale de la production endogène de ce facteur doit induire une augmentation de la mort de la population neuronale étudiée

Le NGF fait partie d'une famille de protéines appelées les neurotrophines (**Figure 20**). Cette famille est également composée du BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) (Barde et al., 1982), de la neurotrophine 3 (NT-3) (Maisonpierre et al., 1990), de la neurotrophine 4/5 (NT-4/5) (Berkemeier et al., 1991), la neurotrophine 6 (NT-6) (Gotz et al., 1994). Les récepteurs des neurotrophines sont des récepteurs à activité tyrosine kinase encore appelés récepteur Trk (**Tableau 3**). Le récepteur du NGF est appelé TrkA. Toutes les neurotrophines se lient également au récepteur p75<sup>NGFR</sup> (récepteur de basse affinité pour le NGF).



**Figure 20 : La famille Trk des récepteurs à tyrosine kinases des neurotrophines.**

TrkA est principalement un récepteur du NGF, TrkB un récepteur du BDNF et du NT-4, TrkC un récepteur du des NT-3. Etant donné le haut degré d'homologie structurale entre les neurotrophines d'une part et les récepteurs Trk d'autre part, il existe un certain degré d'activation croisée entre les facteurs et les récepteurs. Ainsi dans certaines conditions, le NT-3 peut se lier à TrkB et l'activer. De plus, toutes les neurotrophines se lient à un récepteur des neurotrophines de basse affinité dénommé  $p75^{\text{NGFR}}$  (non représenté ici).

	TrkA	TrkB	TrkC	P75 <sup>NGFR</sup>
NGF	++++++			++
BDNF		++++++		++
NT-3	++	+++	++++++	++
NT-4/5	++	+		++

**Tableau 3. Affinité des facteurs neurotrophiques pour leurs récepteurs**

L'inactivation, chez la souris, des gènes codant pour les neurotrophines ou pour leurs récepteurs a confirmé le rôle de ces facteurs dans la survie des neurones spinaux. Par exemple, chez les souris TrkA<sup>-/-</sup>, les neurones sensitifs et sympathiques ne sont plus présents. Les facteurs neurotrophiques NT-3, NT-4/5 et BDNF répondent à tous les critères requis par Oppenheim pour être candidat à la survie des motoneurones. Ces facteurs sont produits par les muscles squelettiques (Henderson et al., 1993) et sont transportés de façon rétrograde par le motoneurone. Leurs récepteurs spécifiques sont exprimés par ces motoneurones durant la période de mort programmée. L'administration de NT-3, NT-4/5 ou de BDNF dans des cultures *in vitro* de motoneurones augmentent leur survie (Henderson et al., 1993) (Comella et al., 1994). *In vivo*, l'ajout exogène de BDNF chez l'embryon de poulet est suffisant pour protéger un tiers des motoneurones normalement destinés à mourir (Oppenheim et al., 1992). Cependant les souris dépourvues des neurotrophines NT-3, NT-4/5 ou BDNF ou dépourvues des récepteurs Trk B ou Trk C ne montrent pas une perte accrue de motoneurones (Snider, 1994) (Lewin and Barde, 1996). La délétion génique d'un seul facteur neurotrophique n'est donc pas suffisante pour modifier significativement la survie des motoneurones suggérant l'action d'un « cocktail » de facteurs (pour revue (Henderson et al., 1998)).

D'autres facteurs neurotrophiques ont également été mis en évidence pour leur rôle dans la survie des motoneurones. Le GDNF (Glial cell line Derived neurotrophic Factor) (Treanor et al., 1996), une autre neurotrophine faisant partie de la famille des TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor) empêche la mort des motoneurones (Yan et al., 1995) (Brunet et al., 2007). Le CNTF (Ciliary Neurotrophic Factor) et le LIF (Leukemia Inhibitory Factor) sont capables de protéger les motoneurones de la mort *in vitro* (Martinou et al., 1992) (Arakawa et al., 1990) et *in vivo* (Sendtner et al., 1992). Néanmoins, le rôle physiologique de ces deux derniers facteurs est controversé puisque leur expression est extrêmement faible au cours de

l'embryogenèse, le nombre de motoneurones survivants n'est pas modifié dans les souris mutantes pour ces deux gènes (Sendtner et al., 1996).

### **II.3 Hypothèse d'une horloge intrinsèque**

La découverte des facteurs neurotrophiques a permis de comprendre comment le nombre de motoneurones survivants est régulé au cours de l'établissement de la jonction neuromusculaire. Cette théorie des facteurs neurotrophiques n'explique pas tous les phénomènes observés. Les neurones commissuraux isolés à différents stades de leur développement commencent à dégénérer *in vitro* au moment précis où ils meurent *in vivo* indépendamment de la présence de la cible (Wang and Tessier-Lavigne, 1999). Dans le cas des motoneurones, des expériences *in vivo* et *in vitro* ont montré que ces neurones enclenchent le programme de mort en fonction de leur stade de différenciation (Homma et al., 1994). Le délai entre la neurogénèse et le stade d'activation de la mort programmée des motoneurones serait fixe (Burek and Oppenheim, 1996) (Gould et al., 1999) (Mettling et al., 1995). Ces expériences suggèrent que dès leur naissance, les neurones sont programmés pour déclencher leur mort s'ils ne rencontrent pas de facteurs neurotrophiques. On verra par la suite que cette théorie a été mise à mal par la démonstration du rôle des récepteurs de mort Fas et TNFR1.

### **II.4 Rôle des caspases dans la mort programmée des motoneurones**

La mort programmée des motoneurones présente toutes les caractéristiques d'une mort cellulaire de type apoptotique : condensation et fragmentation de la chromatine, diminution du volume cellulaire et fragmentation de la cellule en corps apoptotiques. Les débris cellulaires seront phagocytés par les macrophages à proximité (O'Connor and Wytenbach, 1974) (Oppenheim et al., 1978) (Yaginuma et al., 1996).

Différentes techniques sont utilisées pour détecter et quantifier la mort cellulaire au cours du développement embryonnaire (**Tableau 4**).

	<b>Principe de la technique</b>	<b>Quantification</b>
<b>TUNEL</b>	Immunomarquage des fragments d'ADN	<b>Mort</b> Comptage cellulaire : les cellules TUNEL positives sont considérées comme mortes
<b>Hoechst DAPI</b>	Coloration des noyaux	<b>Survie/Mort</b> Comptage cellulaire : Le taux de mortalité cellulaire est calculée sur la base de la morphologie nucléaire : tout noyau condensé ou fragmenté est considéré comme appartenant à une cellule morte
<b>Test d'activité des caspases</b>	Immunodétection des caspases actives	<b>Mort</b> Comptage cellulaire : les cellules positives pour l'immunodétection des caspases actives sont considérées comme mortes
<b>ASP (Apoptosis specific Antigen)</b>	Immunorévélation de l'expression endogène de ASP	<b>Mort</b> Comptage cellulaire les cellules positives pour l'immunorévélation de ASP sont considérées comme mortes
<b>Inhibiteurs fluorescents des caspases :</b> <b>BAF</b> (inhibiteur général des caspases) <b>Z-VAD-fmk</b> (inhibiteurs général des caspases) <b>Ac-DEVD-CHO</b> (inhibiteur des caspases 3 et 7) <b>Ac-YEVD-CHO</b> (inhibiteur de la caspase 1)	Inhibition des caspases : l'inhibiteur agit en se liant au site actif des caspases. L'inhibiteur est attaché à un groupe fonctionnel fmk fluorescent qui rend sa liaison à l'enzyme irréversible.	<b>Survie/mort</b> Comptage cellulaire
<b>Test MTT</b>	Test colorimétrique basé sur la conversion du sel soluble de tétrazolium en un composé pourpre insoluble par les deshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes.	<b>Survie</b> Comptage cellulaire : par densitométrie

**Table 4. Les techniques classiques permettant de mesurer la viabilité ou la mortalité cellulaire et l'éventuelle implication des caspases dans ces phénomènes.**

Depuis 15 ans, de nombreux travaux ont mis en évidence le rôle des voies de signalisation des caspases dans le programme de mort naturelle des motoneurones. Cependant, il convient à ce niveau de différencier la mort cellulaire « précoce » des motoneurones cervicaux qui mérite une attention particulière tant elle diffère de la mort cellulaire que l'on va qualifier de « tardive » (**Figure 19**).

**a) Les exécutants impliqués dans la mort tardive des motoneurones**

Les motoneurones, au cours du développement embryonnaire, peuvent être sauvés de la mort par la surexpression des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 ou par la délétion du gène codant pour la protéine pro-apoptotique Bax (Dubois-Dauphin et al., 1994) (Martinou et al., 1994) (Farlie et al., 1995) (de Bilbao and Dubois-Dauphin, 1996) (Deckwerth et al., 1996; Sato et al., 2006) (White et al., 1998).

L'étude des souris déficientes pour les gènes de la caspase 3 ou de la caspase 9 a montré une diminution du phénomène de mort cellulaire programmée et l'absence de fragmentation d'ADN dans les stades précoces de développement du système nerveux entraînant une organisation anormale du cortex cérébral. Cependant dans ces souris, la structure de la moelle épinière reste normale suggérant un déroulement « normal » de la mort programmée des motoneurones (Kuida et al., 1996) (Hakem et al., 1998) (Kuan et al., 2000) (Oppenheim et al., 2001). Les souris déficientes pour le gène Apaf-1 ne présentent pas de différences en nombre de motoneurones par rapport aux souris contrôles (Oppenheim et al., 2001). Il semble donc que ni la caspase 9 ni Apaf-1 ne participe à la mort des motoneurones. En revanche, la caspase 3 active est exprimée dans les motoneurones en train de mourir chez l'embryon de poulet (Yaginuma et al., 2001a). Le rôle des caspases dans le programme de mort des motoneurones a également été mis en évidence par l'utilisation de peptides inhibiteurs des caspases (**Tableau 4**). Ac-YVAD-CHO (N-Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-CHO) et Ac-DEVD-CHO (N-Ac-Asp-Glu-Val-Asp-CHO), les inhibiteurs respectifs de la caspase 1 et des caspases 3 et 7, peuvent bloquer, *in vivo* et *in vitro*, la mort des motoneurones (Milligan et al., 1995) (Li et al., 1998b). Cependant, ces peptides inhibiteurs ainsi que l'inhibiteur pan-caspase BAF (Boc-aspartyl(OME)-fluoromethylketone) sont incapables de sauver ces motoneurones si le membre a été préalablement excisé (Caldero et al., 1998). Ces derniers résultats suggèrent que d'autres cascades indépendantes des caspases peuvent être impliquées au cours de la mort tardive des motoneurones.

**b) Les exécutants impliqués dans la mort précoce des motoneurones cervicaux**

Le pic de la mort cervicale a lieu entre le 4<sup>ème</sup> et le 5<sup>ème</sup> jour de développement embryonnaire chez le poulet. Cette mort a lieu précocement avant que les axones des motoneurones aient contacté leurs cibles musculaires (Yaginuma et al., 1996). L'activité de la caspase 3 est détectée dans la région cervicale au moment du pic de mort de ces motoneurones (Yaginuma

et al., 2001b). Les noyaux des motoneurones en train de mourir sont marqués par le TUNEL, technique permettant de marquer l'ADN en cours de fragmentation qui est une des caractéristiques de l'apoptose. Ces cellules expriment également la protéine ASP dont l'expression est détectée dans les cellules en train de mourir par apoptose (**Tableau 4**). L'utilisation des inhibiteurs des caspases tel que BAF ou Ac-DEVD-CHO ne fait que retarder la mort cervicale sans la bloquer. Ces différents résultats suggèrent une implication des caspases dans la mort cellulaire précoce des motoneurones pour faciliter l'élimination de la cellule (condensation de la chromatine, fragmentation de l'ADN, phagocytose par les macrophages) sans participer et surtout sans déclencher le programme de mort lui-même (Yaginuma et al., 2001a) (Yaginuma et al., 2001b).

**c) Les voies alternatives « caspases-indépendantes » impliquées dans la mort programmée des motoneurones**

Il existe donc des voies indépendantes des caspases participant au programme de mort des motoneurones au cours de la phase précoce mais également au cours de la phase tardive (Xiang et al., 1996) (McCarthy et al., 1997b) (Janicke et al., 1998) (Sakahira et al., 1998) (Woo et al., 1998) (Zheng et al., 1998) (Cregan et al., 2002) (Xue et al., 1999) (Leist and Jaattela, 2001).

 AIF

L'un des candidats possible est le facteur AIF (voir chapitre 1. VI) (Susin et al., 1999b). La microinjection de AIF dans des cellules *in vitro* est suffisant pour déclencher une condensation de la chromatine et une fragmentation de l'ADN typiquement observées dans les motoneurones issus des souris caspase 3<sup>-/-</sup> ou dans les motoneurones d'embryon de poulet traités par Ac-DEVD-CHO (Oppenheim, 1991) (Yaginuma et al., 2001a). Z-VAD-fmk, le pan-inhibiteur des caspases, ne prévient pas les effets de AIF alors que la surexpression de Bcl-2 prévient le relargage de AIF de la mitochondrie vers le cytosol (Susin et al., 1999b). Le fait que les motoneurones en cours de dégénérescence chez l'embryon de poulet puissent être phagocytés même en présence de l'inhibiteur Ac-DEVD-CHO corrèle avec l'induction par AIF de l'exposition d'une phosphatidylserine à la membrane plasmique. En effet, c'est un signal de phagocytose pour les macrophages (Messmer et al., 2000) (Schlegel et al., 2000). Ces différents résultats suggèrent un rôle potentiel de AIF dans la dégénérescence

programmée des motoneurones même si aucun travail n'a réellement montré à ce jour un relargage de ce facteur dans ces neurones en train de mourir.

#### ⊗ L'autophagie

Un autre candidat possible dans la voie de mort « caspase-indépendante » pourrait être l'autophagie. Deux expériences ont suggéré que l'autophagie pouvait être impliquée, en particulier, dans la mort précoce des motoneurones cervicaux. Tout d'abord ASP (Apoptosis Specific Antigen), un homologue d'Atg5 connu pour être impliqué dans l'autophagie chez les levures (Hammond et al., 1998) (Terwel and van de Berg, 2000), est exprimé dans les motoneurones cervicaux au cours de la phase précoce de mort (Yaginuma et al., 1996). Dans différents modèles de mort cellulaire, il a été constaté une augmentation importante du niveau d'expression de cette protéine ASP (Hammond et al., 1998). Bien que la fonction de ASP reste toujours inconnue chez les vertébrés, cette protéine est exprimée dans de nombreux modèles de mort neuronale, dépendent des caspases ou non (Ayala et al., 1999) (Hammond et al., 1998) (Yaginuma et al., 2001a). D'autre part, des vacuoles autophagiques ont pu être observées dans les motoneurones d'embryon de poulet traités par les inhibiteurs de caspases (Yaginuma et al., 2001a).

### **III. Les récepteurs de mort dans la mort des neurones et des motoneurones**

#### **III.1 Fas/CD95 et la mort neuronale**

Durant le développement, Fas et son ligand sont exprimés transitoirement par des neuroblastes dans le cortex de rat et de façon plus importante, à des stades plus différenciés dans des cultures primaires murines (Cheema et al., 1999). L'expression neuronale de Fas a aussi été détectée par des méthodes immunohistochimiques dans le cerveau de souris juvéniles, sans précision cependant sur la population de neurone concernée (Park et al., 1998). Les motoneurones embryonnaires de rat coexpriment Fas et FasL et entrent rapidement en apoptose par la voie de Fas (Ugolini et al., 2003) quand ils sont cultivés en absence de facteurs trophiques (Raoul et al., 1999) (Raoul et al., 2000) (Raoul et al., 2005). L'utilisation d'un récepteur chimérique constitué de la partie extracellulaire de Fas est suffisante pour bloquer la mort des motoneurones *in vitro*, en l'absence de facteurs neurotrophiques. A l'inverse, l'ajout exogène de FasL déclenche une mort neuronale par apoptose. *In vivo*, l'expression de Fas et FasL a été détectée par RT-PCR dans les motoneurones embryonnaires



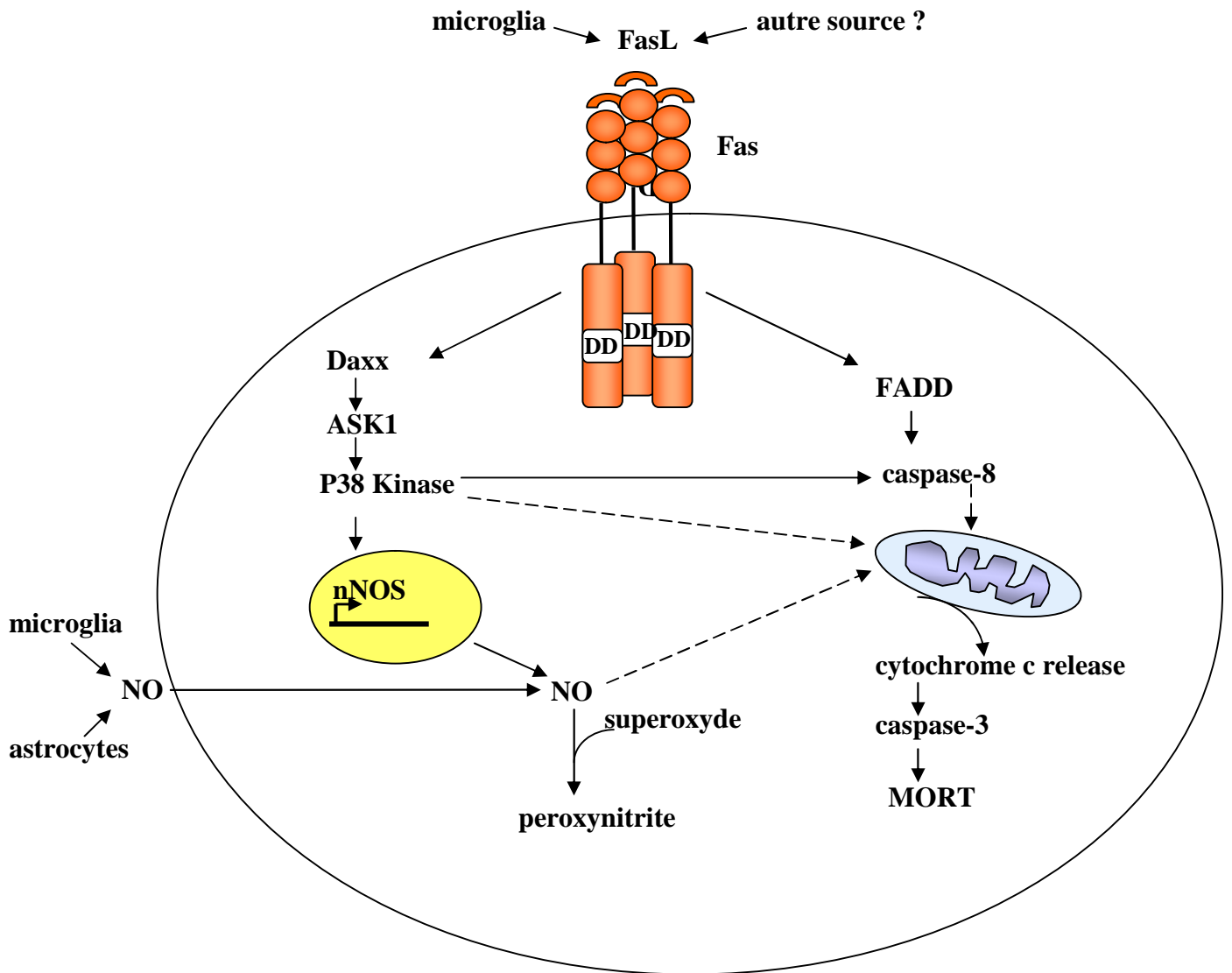
ainsi que par Western blot au moment de leur mort cellulaire programmée (Raoul et al., 1999) (Raoul et al., 2000) (Raoul et al., 2005). L'expression endogène n'a pourtant pas pu être mise en évidence par hybridation *in situ* (HIS) suggérant que le niveau d'expression de ces deux gènes est relativement faible (Raoul et al., 1999).

L'expression de Fas a également été détectée dans des neurones de rats au cours de l'ischémie (Sakurai et al., 1998). Une ischémie de moelle épinière provoque la formation d'un complexe comprenant Fas et la pro-caspase 8, déclenchant l'activation de la caspase 8 et de la caspase 3 et la mort neuronale (Matsushita et al., 2000). On peut également observer une augmentation de l'expression de Fas dans les neurones corticaux après une ischémie cérébrale (Martin-Villalba et al., 1999) (Rosenbaum et al., 2000) dont les effets peuvent être partiellement bloqués par des inhibiteurs spécifiques de la caspase 8 (Felderhoff-Mueser et al., 2000). Enfin, l'expression de Fas a été mise en évidence dans des neurones de patients souffrant de la maladie d'Alzheimer (de la Monte et al., 1997).

Fas peut activer, en parallèle de FADD, une autre voie de mort impliquant le recrutement de la protéine Daxx par le récepteur Fas. La protéine Daxx (Yang et al., 1997b), bien que dépourvue de domaine DD, est capable de s'associer à celui du récepteur Fas mais dans une région distincte de celle de FADD. Daxx peut alors activer une voie de mort indépendamment de FADD faisant intervenir la voie des JNK (c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal Kinase). *In vitro*, Daxx potentialise l'apoptose induite par Fas, mais ne permet pas de compenser l'absence de FADD dans des lignées cellulaires dépourvues de cette dernière. Dans la voie alternative décrite dans les motoneurones embryonnaires (Raoul et al., 2005), Daxx active la MAP kinase kinase ASK1 qui conduit à la phosphorylation de la kinase p38 responsable de l'activation transcriptionnelle et traductionnelle de la NO synthase neuronale. L'expression d'un dominant négatif de Daxx protège les motoneurones, *in vivo*, de la mort induite par Fas (Raoul et al., 2005) (**Figure 21**).

### **III.2 Le TNFR1 et la mort neuronale**

Des travaux récents suggèrent que le TNF $\alpha$  pourrait jouer un rôle important dans le contrôle de la survie neuronale. *In vitro*, le TNF $\alpha$  induit l'apoptose de neurones corticaux de rat et de PC12 différenciées (Reimann-Philipp et al., 2001). D'autre part, des anticorps bloquant dirigés contre le ligand TNF $\alpha$  ou le récepteur TNFR1 protègent en partie les neurones sympathiques et sensoriels d'embryons de souris de la mort induite par déplétion en NGF



**Figure 21 : Les voies de signalisation de Fas dans les motoneurones embryonnaires (d'après Raoul et al 2002).**

Fas peut activer deux voies en parallèle en présence de son ligand FasL. Le recrutement de FADD et de la pro-caspase 8 sur Fas déclenche la voie apoptotique. Fas peut également recruter la protéine Daxx déclenchant une autre voie en parallèle, spécifique des motoneurones et nécessaire dans l'induction de leur mort cellulaire.

(Barker et al., 2001). Dans des modèles expérimentaux de sclérose latérale amyotrophique chez la souris, le TNF $\alpha$  participe à la mort neuronale (Robertson et al., 2001). Chez des patients Parkinsoniens la voie du TNF $\alpha$  pourrait être impliquée dans la mort des neurones dopaminergiques puisque l'expression de FADD semble être augmentée dans ces neurones en dégénérescence (Hartmann et al., 2002).

D'autres travaux ont montré, une diminution de l'activité NF $\kappa$ B, une augmentation de l'activité de la caspase 3 et une augmentation du nombre de neurones TUNEL positifs après lésion de la moelle épinière dans des souris KO TNFR1 $^{-/-}$  ou TNFR2  $^{-/-}$  par rapport aux souris sauvage (Kim et al., 2001). Bessis et Sedel ont montré que le déclenchement, *in vivo*, de la mort naturelle des motoneurones chez l'embryon de rat, entre le douzième et le treizième jour embryonnaire (E12 à E13), est contrôlé par le TNF $\alpha$  produit par les macrophages situés au niveau des somites. L'expression du récepteur a été détectée par immunohistochimie dans les motoneurones entre E12 et E13. L'ajout, *in vitro*, de TNF $\alpha$  sur des explants de motoneurones à E12 est suffisant pour déclencher leur mort observée à E14. En revanche l'utilisation, sur ces mêmes explants, d'anticorps dirigés contre le TNF $\alpha$  bloque cette mort. Si la mort naturelle des motoneurones, issus de souris TNF $\alpha$  $^{-/-}$ , a effectivement lieu, il est à noter que ce processus est fortement réduit dans des explants de motoneurones prélevés chez les souris doublement mutées TNF $\alpha$  $^{-/-}$  et TNFR1 $^{-/-}$  (Bessis et al., 2005; Sedel et al., 2004).

Le TNF $\alpha$  est détecté par immunohistochimie de E1 à E6 chez l'embryon de poulet. Son expression débute au 3<sup>ème</sup> jour de développement embryonnaire dans le tissu nerveux et est maximale dans la partie ventrale du tube neural et dans les motoneurones entre E4 et E5 (Wride and Sanders, 1993) (Wride et al., 1994). La distribution spatiale et temporelle de l'expression du TNF $\alpha$  coïncide avec des régions de l'embryon de poulet touchées par la mort cellulaire programmée (Wride et al., 1994), ce qui a conduit à suggérer un rôle potentiel du TNF $\alpha$  dans ce processus au cours du développement embryonnaire (Wride and Sanders, 1995).

### **III.3 Le récepteur à la neurotrophine P75<sup>NGFR</sup> et la mort neuronale**

Des travaux ont mis en évidence que le récepteur à la neurotrophine (NGF) P75<sup>NGFR</sup> a une homologie avec les autres membres de la famille du TNFR et pourrait jouer un rôle en tant que récepteur de mort. P75<sup>NGFR</sup> pourrait induire la mort de certaines populations neuronales en l'absence des récepteurs TRK. Par exemple, les motoneurones embryonnaires ou

néonataux de souris meurent par apoptose après une exposition au NGF. En revanche, ces mêmes cellules issues de souris déficientes en  $P75^{NGFR}$  ne meurent pas (Sedel et al., 1999) (Wiese et al., 1999). Ces cellules montrent même une augmentation de leur capacité de survie après une axotomie en comparaison aux motoneurons sauvages, suggérant que  $P75^{NGFR}$  pourrait être impliqué dans la mort neuronale (Ferri et al., 1998) (Bamji et al., 1998) (Frade and Barde, 1999). Les souris  $P75^{NGFR-/-}$  montrent également une diminution du taux de mort des interneurons de la moelle épinière, des neurones de la rétine et des neurones sympathiques (Harada et al., 2006).

#### **IV. La voie endolysosomale et la mort neuronale**

De nombreuses observations suggèrent que les neurones affectés dans des maladies neuromusculaires telles que la sclérose latérale amyotrophique (SLA) ou la paraplégie spastique présentent un trouble du trafic endosomal. Les études génétiques renforcent l'hypothèse que cette perturbation des endosomes joue un rôle clé dans ces pathologies et dans plusieurs autres maladies neurodégénératives telles que les maladies d'Alzheimer, de Parkinson ou de Huntington. C'est ainsi que dans une proportion importante de cas, la SLA est causée par une mutation récessive du gène *ALS2* qui code pour Alsln, une protéine qui semble fonctionner comme un facteur d'échange de guanine pour rab5, une GTPase impliquée dans le trafic endosomal (Otomo et al., 2003). Des souris déficientes en *ALS2* montrent des perturbations du trafic endosomal associées à des comportements moteurs anormaux (Devon et al., 2006). Des cas de SLA (non SOD) et aussi de démence fronto-temporale ont été liés à des mutations de *CHMP2B*, une protéine centrale d'ESCRT-III, l'un des complexes « ESCRT » (Endosomal sorting complex required for transport) nécessaires à la maturation des endosomes (Skibinski et al., 2005). Un autre exemple est la protéine spastine dont le gène est muté dans 40% des cas de formes familiales autosomales dominantes de paraplégie spastiques (Reid et al., 2005). La spastine est un partenaire de *CHMP1B*, un autre membre du complexe ESCRT-III.

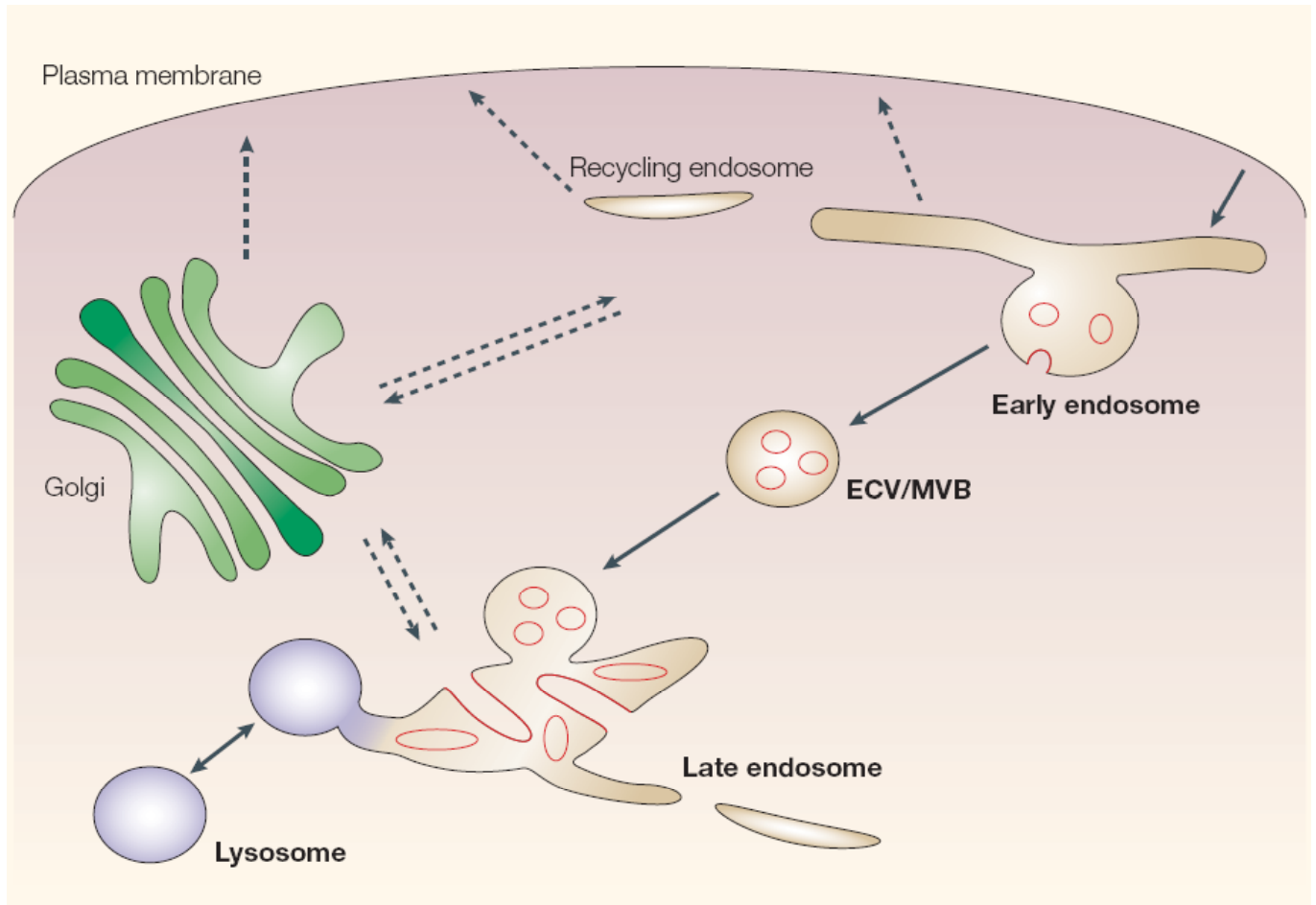
## **Chapitre 3. Alix : un lien entre la voie endolysosomale et la mort cellulaire**

### **I. Alix et la voie endolysosomale**

#### **I.1 La formation des corps multivésiculés au cours de la voie endolysosomale**

##### **a) La voie endolysosomale**

L'endocytose est un processus fondamental de la vie cellulaire consistant en l'internalisation de portions de la membrane plasmique, de protéines membranaires et de leurs ligands vers des compartiments intracellulaires. Les protéines membranaires sont internalisées vers des endosomes soit de façon constitutive, comme dans le cas des récepteurs impliqués dans l'approvisionnement cellulaire en nutriments tels que le récepteur à la transferrine, soit de façon induite par la liaison de leurs ligands, comme dans le cas des récepteurs de mort ou les récepteurs de type tyrosine kinase. La voie majeure d'internalisation des protéines membranaires est la voie dite dépendante de la clathrine qui passe par la formation de structures spécialisées à partir de la membrane plasmique. Ces structures sont caractérisées par la présence d'un manteau protéique constitué majoritairement du complexe adaptateur AP-2 et de la clathrine. AP-2 contrôle la polymérisation de la clathrine à la membrane et sélectionne les molécules à internaliser. Les récepteurs endocytés se retrouvent très rapidement au niveau de l'endosome dit précoce (EE : early endosome). C'est à ce niveau que le tri des molécules transmembranaires endocytées se fait. Les molécules peuvent être recyclées à la membrane plasmique ou adressées vers d'autres compartiments cellulaires comme l'appareil de Golgi (TGN : Trans Golgi network) ou des compartiments tardifs de l'endocytose pour y être dégradées. La morphologie tubulo-vésiculaire et l'acidité intravésiculaire (pH=6) sont les caractéristiques essentielles de cet endosome précoce. Les molécules destinées à la surface cellulaire sont très rapidement adressées dans le compartiment de recyclage (RE : recycling endosome) tandis que les récepteurs de surface destinés à la dégradation passent dans les compartiments tardifs de la voie endocyttaire composés de trois populations endosomales : les corps multivésiculaires (CMV ou MVB : multivesicular body ou encore appelé ECV : endosomal carrier vesicles), les endosomes tardifs (LE : late endosome) et les lysosomes (Mukherjee et al., 1997) (**Figure 22**). Un signal de tri permettant d'adresser les molécules vers les endosomes de recyclage (RE) ou vers la dégradation est l'ubiquitine puisque seuls les récepteurs de surface ubiquitinylés sont triés et



**Figure 22 : La voie endolysosomale (Grunberg et al 2004).**

Les molécules internalisées se retrouvent dans un premier dans un compartiment endosomal précoce (EE : early endosome). Les récepteurs « housekeeping » sont recyclés à la membrane directement à partir de ce compartiment ou via les endosomes de recyclage (RE : recycling endosome). Les autres molécules, telles que les récepteurs de signalisation ubiquitinylés, sont incorporés dans des vésicules intraluminales situées dans le compartiment endosomal multivésiculé appelé MVB (Multivesicular Bodies). Les MVB fusionnent ensuite avec les endosomes tardifs (LE: Late endosome). Une partie de ces endosomes tardifs peut fusionner avec l'appareil de Golgi permettant le recyclage de certaines molécules tandis que les autres endosomes tardifs fusionnent avec le lysosome conduisant à la dégradation de ces vésicules intraluminales.

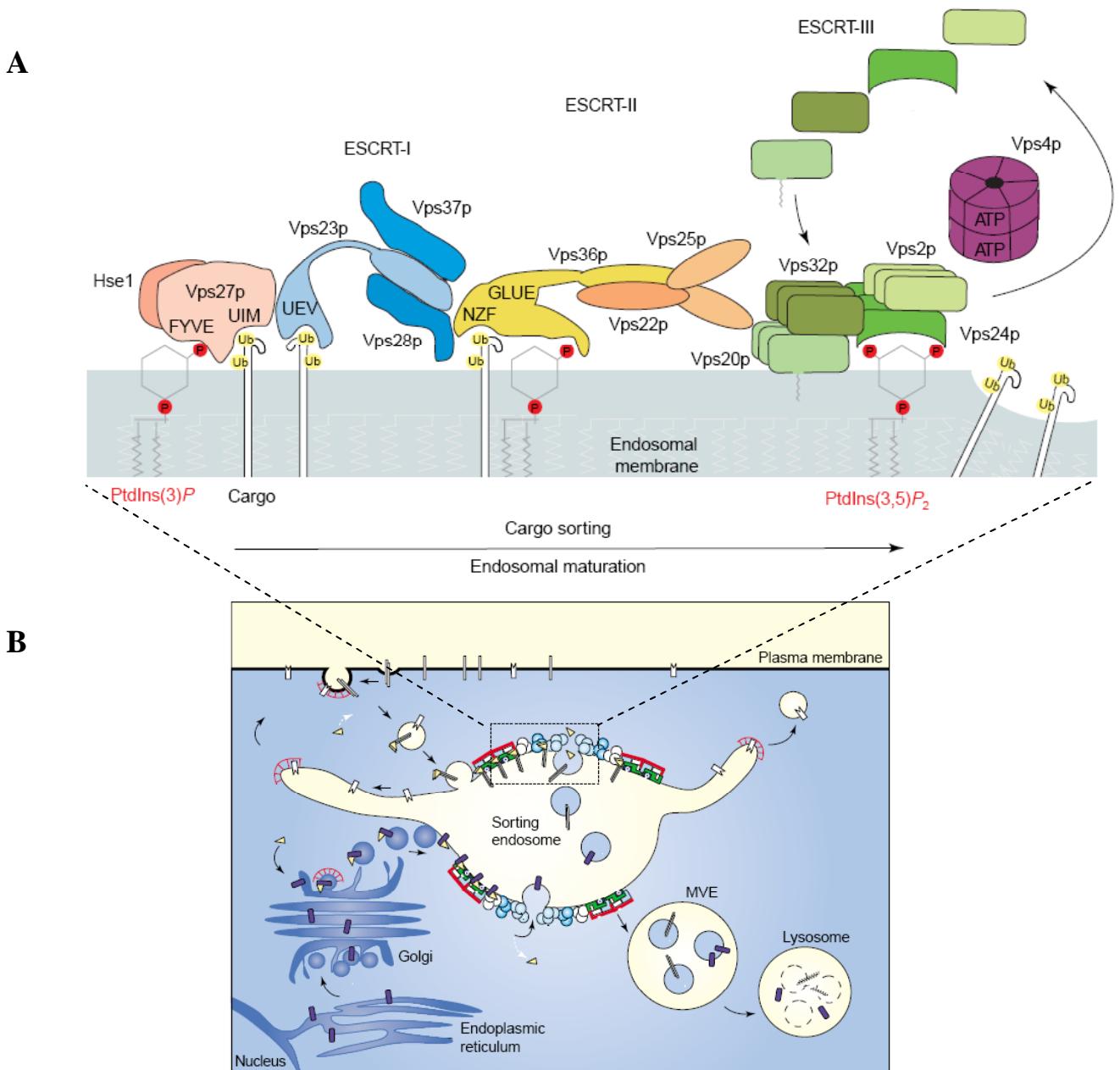
incorporés dans les vésicules intraluminales des corps multivésiculés. Ce compartiment fusionnera avec les endosomes tardifs qui fusionneront à leur tour avec les lysosomes permettant ainsi l'hydrolyse et la destruction de ces protéines (Gruenberg and Stenmark, 2004). L'idée communément admise est que la formation des corps multivésiculés est l'étape qui isole la plateforme de signalisation du récepteur du reste de la cellule et permet d'inactiver la cascade induite par la liaison du ligand au récepteur.

La formation des CMV nécessite trois complexes protéiques hétérologomériques : ESCRT-I, ESCRT-II et ESCRT-III (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) qui s'associent de façon séquentielle sur la face cytosolique de la membrane endosomale. Ces complexes protéiques permettent la formation de vésicules depuis la membrane endosomale vers la lumière de ce compartiment (Jang et al., 2002) (Katzmann et al., 2002) (Raiborg et al., 2003) (**Figure 23**).

#### **b) Les ESCRTs**

Les protéines composant les complexes ESCRTs ont été initialement décrits chez la levure grâce aux mutants *Vps* (Vacuolar protein sorting) de classe E. La mutation des protéines *Vps* empêche le tri des protéines trans-membranaires en provenance de l'appareil de Golgi ou de la membrane plasmique vers la vacuole des levures (équivalent du compartiment lysosomal chez les eucaryotes supérieurs) et conduit à l'apparition d'un compartiment endosomal multi-lamellaire aberrant appelé compartiment de classe E. Des homologues des *vps* ont été décrits chez plusieurs espèces des nématodes à l'homme ce qui complexifie notablement la classification (**Figure 24**). 10 des 18 gènes de type classe E codent pour des sous-unités des complexes ESCRTs (**Figure 24**) (pour revue, (Slagsvold et al., 2006) (van der Goot and Gruenberg, 2006) (Malerod and Stenmark, 2007)).

La première étape de tri des récepteurs est réalisée par un complexe de deux protéines *Vps27/Hrs* (Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrat) et *Hse1/STAM* (Signal Transducing Adaptor Molecule). Cette étape se fait dès l'endosome précoce. Ce complexe, aussi appelé ESCRT 0 est recruté sur les parties cytoplasmiques mono- ou poly-ubiquitinylées de protéines membranaires et qui seront transférées sur le complexe ESCRT-I via l'interaction de *Vps27/Hrs* avec *Vps23* (Li et al., 1999a). ESCRT-I est constitué de trois sous-unités : *Vps23* (connu chez les mammifères sous le nom de *Tsg101*), *Vps28* et *Vps37*. Les cargos protéiques ubiquitinylés passent ensuite du complexe ESCRT-I au complexe



**Figure 23 : Les ESCRTs permettent le tri des protéines ubiquitinylées et la formation des corps multivésiculés (Slagsvold et al 2006, Raiborg et al 2003).**

A. La première étape de tri des récepteurs est réalisée par un complexe aussi appelé ESCRT-0 composé de deux protéines Vps27/Hrs (Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrat) et Hse1/STAM (Signal Transducing Adaptor Molecule) dès les endosomes précoces. Ce complexe interagit avec les protéines mono- ou poly-ubiquitinylées et les transfère sur le complexe ESCRT-I via l'interaction de Vps27/Hrs avec Vps23/Tsg101. Le complexe ESCRT-I est constitué de trois sous-unités : Vps23, Vps28 et Vps37. Les cargos protéiques ubiquitinylés passent ensuite du complexe ESCRT-I au complexe ESCRT-II, formé à partir des sous-unités Vps22, Vps25 et Vps36. Le complexe ESCRT-III est enfin recruté sur la membrane endosomale via son interaction avec la sous-unité Vps25 d'ESCRT-II. Le complexe ESCRT-III est constitué de Vps20, Vps24, Vps2, et Vps32. Lorsque le complexe ESCRT-III est associé à la membrane endosomale, il permet son bourgeonnement vers la lumière de l'endosome sous forme de vésicules. C'est la dissociation membranaire du complexe ESCRT-III par l'ATP-ase Vps4 de type AAA qui permet le décrochage des vésicules de la membrane vers la lumière endosomale résultant en une structure de corps multivésiculaires.

B. Les récepteurs protéiques ubiquitinylés, une fois endocytés à la membrane plasmique, sont dirigés depuis les endosomes précoces vers les endosomes de tri. C'est à la surface membranaire de ces endosomes de tri que les complexes ESCRTs sont localisés et permettront la formation des corps multivésiculés (CMV ou MVE).



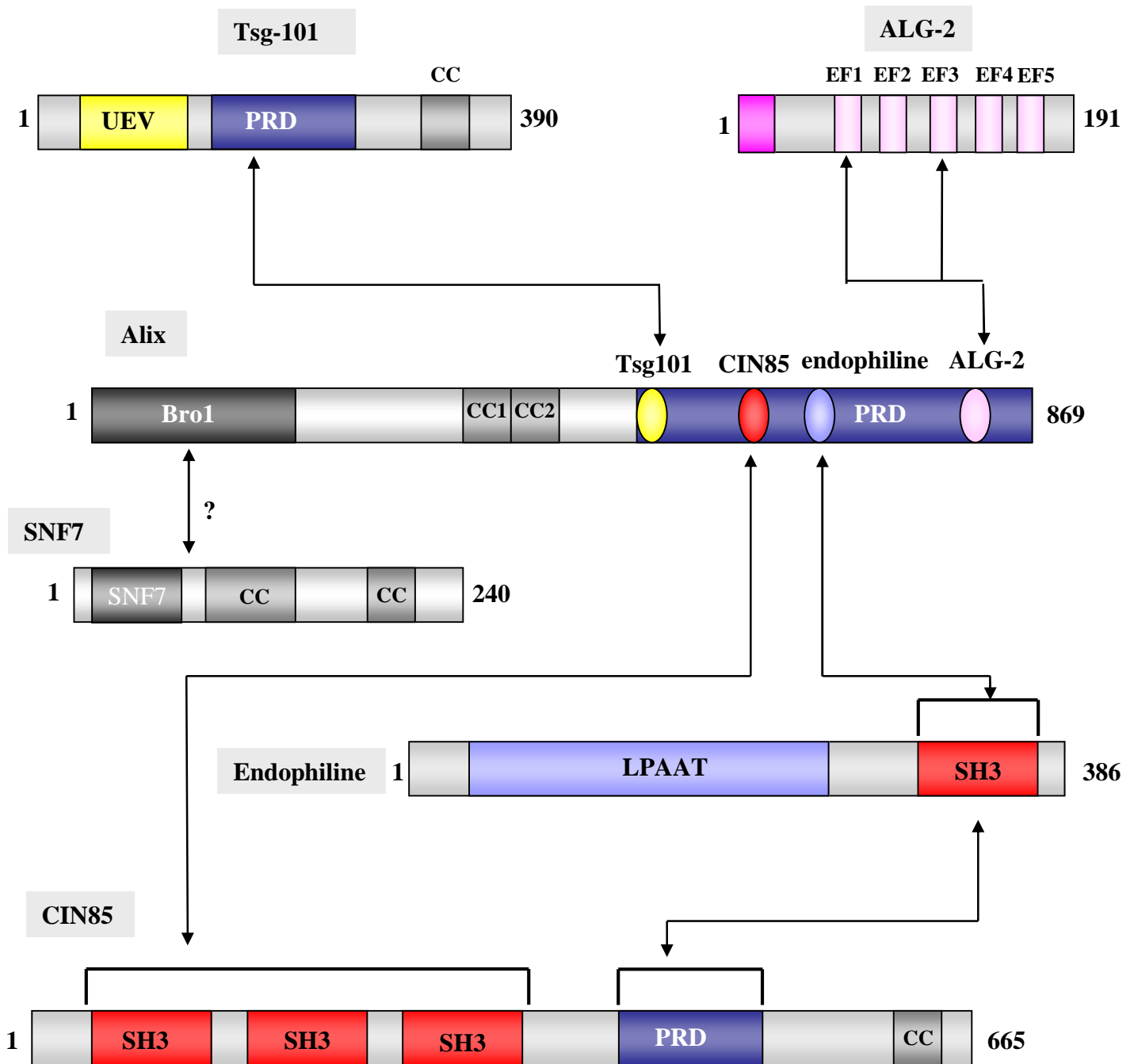
ESCRT	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		<i>Homo sapiens</i>		<i>Drosophila melanogaster</i>		<i>Caenorhabditis elegans</i>					
	No.	Accession <sup>a</sup>	No.	Accession	Other names	No.	Accession	Other names				
I	<b>Vps23p/</b>	1 NP_009919	1	NP_006283	Tsg101	1	NP_524120	Tsg101	1	NP_500364	C09G12.9	
	<b>Stp22p<sup>b</sup></b>											
	<b>Vps28p</b>	1 NP_015260	2	NP_057292 <sup>c</sup> NP_898880 <sup>c</sup>			1	NP_652053	CG12770	1	CAB54493	Y87G2A.10
II	<b>Vps37p/</b>	1 NP_013220	4	AAH22363 NP_078943 NP_060436 XP_379866	Vps37A/HCRP1 Vps37B/FLJ12750 Vps37C/FLJ20847 Vps37D/Wbscr24	2	AY070595 AY069687	RE69619 LD45836	1	NP_504474	CD4.4	
	<b>Srn2p</b>											
	<b>Vps22p/</b>	1 NP_015323	1	NP_009172	EAP30		1	NP_650987	CG6637	1	NP_498052	C27F2.5
III	<b>Snf8p</b>											
	<b>Vps25p</b>	1 NP_012636	1	NP_115729	EAP20		1	NP_610398	CG14750.	1	NP_493230	W02A11.2
	<b>Vps36p/</b>	1 NP_013521	1	NP_057159	EAP45		1	NP_648660	CG10711	1	NP_505798	tag-318/ F17C11.8
Others	<b>Vac3p</b>											
	<b>Vps2p/</b>	1 NP_012924	2	NP_055268 <sup>c</sup> NP_940818 <sup>c</sup> NP_054762	CHMP2A CHMP2B	1	NP_651455	CG14542	1	NP_496717	Y46G5A.12	
	<b>Did4p</b>											
Others	<b>Vps20p/</b>	1 NP_013794	1	NP_078867	CHMP6	2	NP_726213 NP_611686	CG4071-PB: A and B	1	NP_490762	Y65B4A.3	
	<b>Chm6p</b>											
	<b>Vps24p/</b>	1 NP_012883	2	NP_057163 <sup>c</sup> NP_00100575 3 <sup>c</sup>	CHMP3	1	NP_649451	CG9779	1	NP_494919	T27F7.1	
Others	<b>Did3p</b>											
	<b>Vps32p/</b>	1 NP_013125	3	NP_054888 NP_789782 AAH14321	HSPC134/ CHMP4A CHMP4B CHMP4C	1	NP_610462	CG8055	2	NP_505022 AAA68771	C37C3.3 tag-309/ C56C10.3	
	<b>Snf7p</b>											
Others	<b>Vps4p/</b>	1 NP_015499	2	NP_037377.1 NP_004860.2	Vps4A Vps4B	1	NP_573258	CG6842	1	NP_490816.3	Y34D9A.10	
	<b>Did6p</b>											
	<b>Vps27p/</b>	1 NP_014403	1	NP_004703.1	Hrs/HGS	3	NP_722831 NP_525099 NP_722830	Hrs/ A, B and C	1	NP_501375.2	hgrs-1	
Others	<b>Did7p</b>											
	<b>Hse1p</b>	1 NP_011861.1	2	NP_003464 NP_005834	STAM1 STAM2	1	NP_477448	Stam	1	NP_491710.2	pqn-19	
	<b>Vps31p/</b>	1 NP_015241	1	NP_037506.2	Alix/AIP1/DRIP4	1	NP_651582	CG12876	4	NM_066812 <sup>3</sup> NM_001027543 <sup>3</sup> NM_001027542 <sup>3</sup> NM_001027544 <sup>3</sup>	alx-1	
Others	<b>Bro1p</b>											
	<b>Vps44p/</b>	1 NP_010744.1	1	NP_006350.1	SLC9A6	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
	<b>Nhx1p</b>											
Others	<b>Vps46p/</b>	1 NP_012961.1	2	NM_002768 NP_065145.2	CHMP1A CHMP1B	1	NP_649051	Chmp1/ CG4108	1	NP_490974.1	F23C8.6	
	<b>Did2p</b>											
	<b>Vps60p/</b>	1 NP_010774.2	1	NP_057494.2	CHMP5	1	NP_648997	CG6259	1	NP_505219.1	F41E6.9	
Others	<b>Mos10p</b>											
	<b>Vta1p</b>	1 NP_013282.1		NM_016485	LIP5/SBP1		NP_647640	CG7967		NP_492139.2	T23G11.7	

Figure 24 : Les orthologues des protéines de classe E chez la levure, l'homme, la drosophile et les nématodes (Slagsvold et al 2006).

ESCRT-II, formé des protéines Vps36, Vps22 et Vps25. Le complexe ESCRT-III est ensuite recruté sur la membrane endosomale via son interaction avec Vps25 d'ESCRT-II. Le complexe ESCRT-III est constitué de Vps20, Vps24, Vps2, et Vps32/SNF7 (Sucrose Non Fermenting). Vps2 et Vps32 sont aussi appelées respectivement chez les mammifères CHMP2 A/B (CHarged Multivesicular body Protein 2) et CHMP4 A/B/C. Lorsque le complexe ESCRT-III est associé à la membrane endosomale, il permet son bourgeonnement vers la lumière de l'endosome sous forme de vésicules. La dissociation membranaire du complexe ESCRT-III est nécessaire pour que la vésicule en bourgeonnement soit achevée et libérée dans la lumière de l'endosome. C'est une ATP-ase appelée Vps4 qui permet la dissociation du complexe ESCRT-III. Sa mutation entraîne un blocage de la voie endolysosomale (**Figure 23**) (Fujita et al., 2003).

## **I.2 Alix et la formation des corps multivésiculés**

Alix (ALG-2 Interacting protein X)/AIP1 (Apoptosis Interacting Protein 1) a été pour la première fois identifiée par la technique de double hybride comme étant un partenaire d'ALG-2 (Apoptosis Link Gene 2), une calci-protéine impliquée dans la mort cellulaire (Missotten et al., 1999) (Vito et al., 1999). Alix est une protéine adaptatrice cytoplasmique, de 869 acides aminés chez la souris qui est extrêmement conservée à travers les espèces. Sa partie C-terminale contient un domaine riche en proline appelé PRD. Ce domaine PRD est central pour la majorité des interactions d'Alix avec ses partenaires (**Figure 25**). Il contient plusieurs motifs  $P^{748}xRPPPP^{761}$  nécessaires à l'interaction d'Alix avec les domaines SH3 des endophilines (Chatellard et al., 2002) et de CIN85 (Cbl-INteracting protein of 85 kDa) (Chen et al., 2000). On y retrouve aussi un motif P[T/S]AP nécessaire à l'interaction d'Alix avec la protéine Tsg101 du complexe ESCRT-I (Strack et al., 2003) ainsi que deux motifs PPXY (723-726 ; 835-838) consensus pour l'interaction avec l'ubiquitine ligase Nedd-4 qui semble jouer un rôle dans l'internalisation des protéines membranaires (Ingham et al., 2004) (Nikko and Andre, 2007). La région N-terminale d'Alix contient un domaine Bro1 permettant sa liaison à la protéine SNF7/CHMP4, une des sous-unités d'ESCRT-III (Katoh et al., 2003). Tous ces interacteurs d'Alix sont impliqués dans le trafic endolysosomal (pour revue (Odorizzi, 2006) (Mattei et al., 2006) (Sadoul, 2006)) (**Figure 25 A**). La cristallisation du mutant d'Alix délété de son domaine PRD a permis de mettre en évidence son organisation spatiale. Le domaine BRO1, situé à l'extrémité N-terminale d'Alix, est rattaché par un pont



**Figure 25 : Représentation d'Alix et de ses différents interacteurs.**

Alix se lie à ses principaux interacteurs : Tsg101 (Complexe ESCRT-I), SNF7 (complexe ESCRT-III), les endophilines, CIN85 et ALG-2 par son domaine riche en proline (PRD). Les endophilines et CIN85 peuvent également interagir ensemble par le domaine SH3 (Src Homology 3) et PRD respectivement.

SH3 (Sarc Homology 3) : domaine qui se lie au motif proline PxxP; CC (coiled-coiled) : domaine impliquée dans l'oligomérisation des protéines; LPAAT : activité acide lysophosphatidique acyltransférase des endophilines; UEV (ubiquitin conjugating enzyme E2 variant); EF

hydrophobe à un domaine formant une structure en « V » composée de deux bras, chacun possédant trois hélices empaquetées (**Figure 25 B**) (Fisher et al., 2007) (Göttlinger, 2007).

#### **a) Alix et les ESCRTs**

Bro1/Vps31, l'un des homologues d'Alix chez les levures, a été caractérisé comme un des membres de la famille des Vps de classe E ne faisant pas partie des ESCRTs (Nikko et al., 2003) (Odorizzi, 2006) (**Figure 24**). Bro1/Vps31 est recruté à la membrane endosomale par le complexe ESCRT-III (Kim et al 2005) mais ne possède pas la séquence P[T/S]AP susceptible de s'associer avec Vps23/Tsg101. Ces résultats suggèrent qu'Alix pourrait avoir un rôle dans la régulation de la machinerie des ESCRTs permettant la formation des corps multivésiculés (CMV) (Kato et al., 2003) (Martin-Serrano et al., 2003a) (Strack et al., 2003) (von Schwedler et al., 2003) (**Figure 23**). Pourtant, l'extinction de l'expression d'Alix ou de l'expression d'Alix et de la sous-unité Vps25 du complexe ESCRT-II par la méthode des siRNA n'empêchent pas la dégradation du récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor), un récepteur classiquement dégradé dans la voie endolysosomale (Cabezas et al., 2005) (Schmidt et al., 2004) (Schmidt et al., 2005). En revanche, il a été montré récemment qu'Alix interagit avec le récepteur à la vasopressine et favoriserait sa dégradation dans les lysosomes (Yi et al., 2007). D'autre part, l'homologue d'Alix, chez *C.elegans*, joue un rôle dans la régulation du trafic endolysosomal de la protéine transmembranaire LIN12, l'homologue de Notch chez les mammifères (Shaye and Greenwald, 2005). Dans ce modèle, l'extinction de l'expression d'Alix par des siRNA entraîne une accumulation de la protéine LIN12 dans des vésicules et bloque la dégradation naturelle de cette protéine dans les cellules précurseurs de la vulve (VPC). Alix pourrait donc avoir un effet spécifique sur le recyclage de certaines protéines.

#### **b) Alix et le LBPA**

Le LBPA (Acide 2,2' LysoBisPhosphatidique) est un lipide enrichi dans les vésicules intraluminales des CMV et les endosomes tardifs. L'utilisation d'anticorps dirigés contre le LBPA, dans la lignée cellulaire BHK-21, bloque la formation des vésicules intraluminales et désorganise la morphologie des CMV (Kobayashi et al., 1998). *In vitro*, des liposomes préparés à partir de LBPA forment spontanément des vésicules intraluminales analogues aux vésicules observées dans les CMV (Matsuo et al., 2004). Ces travaux suggèrent que l'enrichissement en LBPA au niveau des endosomes permet le processus de vésiculation à

l'origine de la formation des CMV. Alix est capable de s'associer aux liposomes contenant du LBPA (Matsuo et al., 2004). Dans les cellules Hela, l'extinction de l'expression d'Alix par des siRNA est suffisante pour diminuer l'expression du LBPA, détectée par immunofluorescence, au niveau des endosomes tardifs et le nombre d'endosomes tardifs contenant les vésicules intraluminales (Matsuo et al., 2004). La relation entre Alix et le LBPA est spécifique des eucaryotes supérieurs, le LBPA n'étant pas détecté chez la levure. Alix pourrait être un des modulateurs de ce processus. Toutefois, la relation existant entre Alix et le LBPA n'est pas nécessairement à relier à celle d'Alix avec les ESCRTs. Effectivement, White et al ont montré récemment, *in vitro*, par immunofluorescence, que la population de CMV contenant le récepteur à l'EGF à la surface des vésicules intraluminales n'est pas la même que la population de CMV marquée par un anticorps dirigé contre le LBPA (White et al., 2006).

### **I.3 Alix et ses partenaires de la voie endocytaire**

#### **a) Alix et les endophilines**

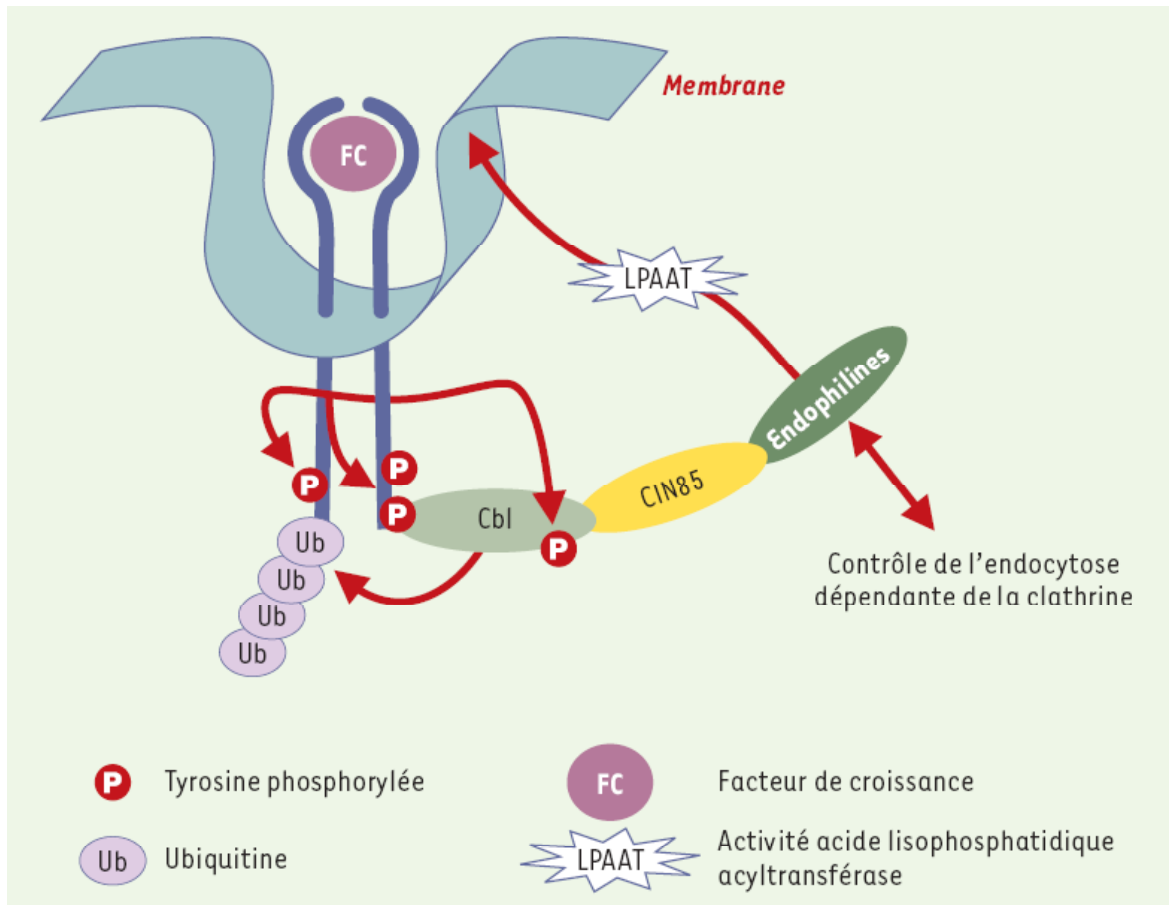
Alix pourrait également participer à la régulation de la formation des CMV via les endophilines (pour revue (Odorizzi, 2006) (Sadoul, 2006)). Notre laboratoire a montré qu'Alix est capable de lier le domaine SH3 des endophilines par la séquence PxRPPPP située dans le domaine PRD (Chatellard-Causse et al., 2002) (**Figure 25**). Les endophilines interagissent directement avec la dynamine et la synaptojanine (Slepnev and De Camilli, 2000) (Song and Zinsmaier, 2003), deux protéines contrôlant l'endocytose dépendante de la clathrine. L'importance de leur fonction dans la régulation du processus d'endocytose a été mise en évidence par leur capacité d'induire une courbure de la membrane plasmique (Huttner and Schmidt, 2000). Plus récemment, il a été montré, chez la drosophile, que l'endocytose est bloquée en l'absence d'endophilines (Verstreken et al., 2002). Les endophilines ont également un domaine de type BAR (Bin/Amphiphysin/Rvs) qui interagit avec la bicouche lipidique et pourrait peut-être la déformer. D'autre part, différents mutants d'Alix, notamment la moitié C-terminale d'Alix (Alix-CT), sont capables de former des structures tubulo-vésiculaires périnucléaires. Ce phénomène de vacuolisation est augmentée par la co-expression des endophilines (Chatellard-Causse et al., 2002). Ces structures ne colocalisent pas avec les marqueurs classiques des différents compartiments de la voie endolysosomale tel que EEA1

qui marque les endosomes précoces ou LAMP1 qui marque les endosomes tardifs. La morphologie de ces compartiments n'est pas affectée par la surexpression d'Alix-CT.

## **b) Alix et CIN85**

Le domaine PRD d'Alix est également capable d'interagir avec le domaine SH3 de CIN85 (aussi connue sous le nom de SETA ou de Ruk), une protéine impliquée dans l'endocytose des récepteurs aux facteurs de croissance de type tyrosine kinase (Take et al., 2000) (Petrelli et al., 2002) (Soubeyran et al., 2002) (**Figure 25**). CIN85 est une protéine adaptatrice qui contient un domaine PRD, des domaines SH3 lui permettant également d'interagir avec les endophilines et des domaines coiled-coiled permettant son oligomérisation (pour revue (Odorizzi, 2006) (Sadoul, 2006). CIN85 a été caractérisée pour la première fois comme un interacteur de Cbl (Casitas B lineage lymphoma), une protéine à activité ubiquitine ligase de type « RING Finger » (**Figure 26**). Cbl se lie au récepteur activé en se liant aux résidus tyrosines phosphorylées des kinases activées et est en retour phosphorylé par le récepteur (Thien and Langdon, 2001). Cette dernière modification permet le recrutement de CIN85 constitutivement associé aux endophilines conduisant à l'endocytose du récepteur activé. Cbl agit aussi en catalysant l'ajout de molécules d'ubiquitine sur le récepteur entraînant le ciblage du récepteur vers la voie de dégradation endo-lysosomale. Cbl est également capable de s'auto-ubiquitiner et d'ubiquitiner CIN85. La fixation du ligand sur son récepteur de type tyrosine kinase induit donc la formation d'un complexe comprenant quatre partenaires : le récepteur phosphorylé, Cbl phosphorylée, CIN85 et les endophilines, favorisant l'internalisation du récepteur et sa dégradation dans les lysosomes (Szymkiewicz et al., 2002) (**Figure 26**).

Alix est donc capable d'interagir avec les principaux régulateurs de l'endocytose : CIN85, les endophilines, le complexe ESCRT-I (Tsg101) et le complexe ESCRT-III (CHMP4) suggérant un rôle dans la régulation de l'endocytose des récepteurs, et en particulier ceux de type tyrosine kinase, depuis les endosomes précoces jusque dans le lysosome. Les travaux de Schmidt semblent confirmer cette hypothèse puisqu'ils prétendent que l'extinction de l'expression d'Alix par des siRNA est suffisante pour augmenter l'endocytose du récepteur à l'EGF (Schmidt et al., 2004). Au vu des résultats de Schmidt et al., il est toutefois à noter que cet effet reste en réalité extrêmement modéré. A l'inverse, la surexpression d'Alix semble diminuer l'ubiquitination du récepteur à l'EGF ainsi que son endocytose. L'interprétation de



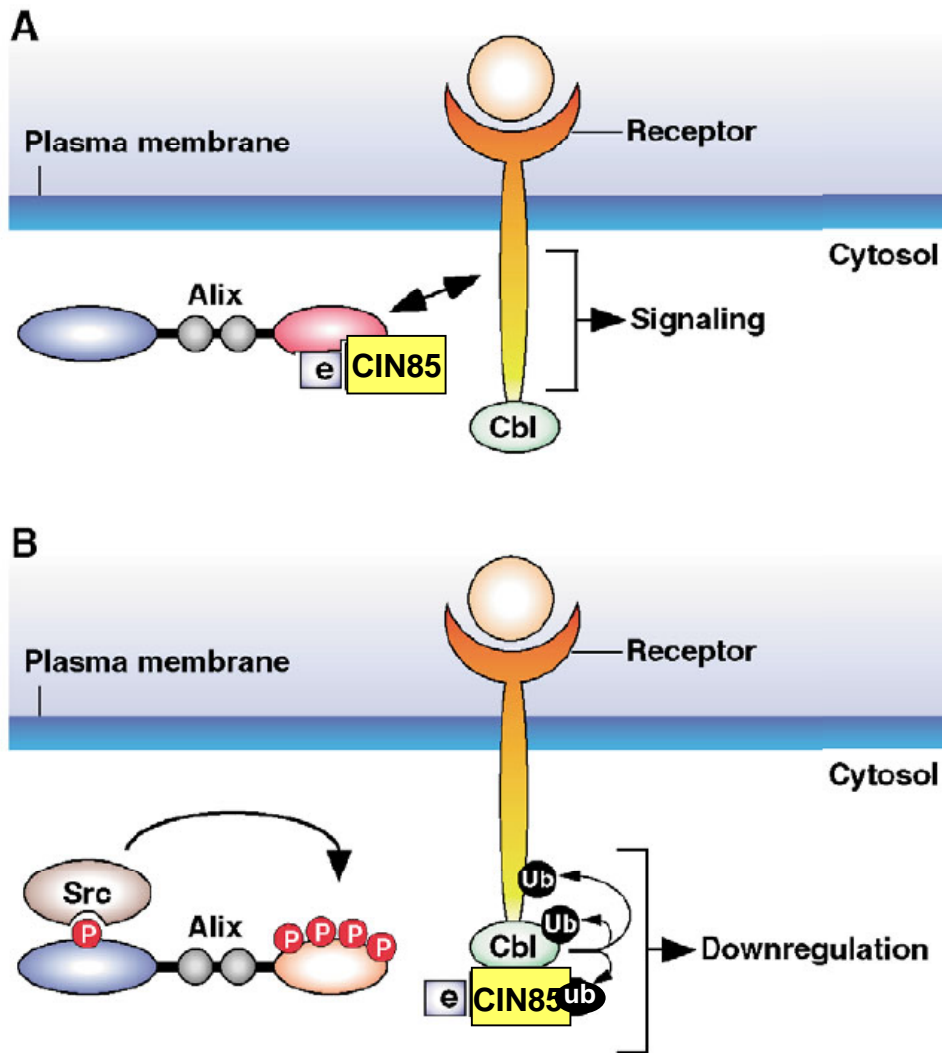
**Figure 26 : Rôle du complexe Cbl/CIN85/endophilines dans l'internalisation des récepteurs (Soubeyran et al 2002).**

La reconnaissance du facteur de croissance par le récepteur entraîne sa dimérisation et l'autophosphorylation de sa partie cytoplasmique. Cbl se lie au récepteur activé, au niveau de résidus tyrosines phosphorylées et est en retour phosphorylé par le récepteur. Cbl peut alors recruter CIN85 qui est constitutivement associé aux endophilines. Les endophilines, en modifiant le contenu phospholipidique de la membrane, induisent l'invagination de la membrane puis la formation d'une vésicule d'endocytose.

Schmidt et al est qu'Alix surexprimé bloque l'interaction de Cbl avec CIN85 en séquestrant le couple CIN85-endophiline, en empêchant leur interaction avec Cbl (**Figure 27**). Cependant, aucun effet d'Alix n'a été observé sur la dégradation du récepteur à l'EGF (Schmidt et al., 2004) (Fauré et Sadoul non publié). Alix est régulée négativement par Src, une protéine kinase activée après stimulation des récepteurs de type tyrosine kinase. Src se lie à Alix au niveau de son domaine Bro1 puis au niveau de son domaine PRD et hyperphosphoryle Alix (**Figure 27**). Sous cette forme, Alix perd sa capacité à lier CIN85 et se relocalise dans le cytosol (Schmidt et al., 2005). Alix interagit également avec le récepteur PDGFR $\beta$  (Platelet Derived Growth Factor  $\beta$  Receptor). La surexpression d'Alix entraîne l'hyperphosphorylation de c-Cbl, modifiant son interaction avec le récepteur PDGFR $\beta$  et favorisant la dégradation de c-Cbl dans le protéasome. Dans ces conditions, le récepteur PDGFR $\beta$  est moins ubiquitinylé et donc moins dégradé (Lennartsson et al., 2006). Chez le Xénope, l'homologue d'Alix, appelé Xp95, est aussi phosphorylée par Src au cours de la seconde division méïotique de l'œuf de Xénope et pourrait fonctionner dans une cascade de transduction de signal (Che et al., 1999) (Dejournett et al., 2007).

Enfin, Alix interagit avec la « Focal adhesion Kinase » (FAK) et avec la tyrosine Kinase 2 (Pyk-2) (Schmidt et al., 2003) (Schmidt et al., 2005). Alix semble pouvoir moduler le niveau de phosphorylation de ces kinases et par cette voie, conduit à une modification de l'adhésion cellulaire. Il a été également montré une interaction moléculaire entre Alix et différentes protéines du cytosquelette par immunoprécipitation (l'actine, l' $\alpha$ -actinine, la cortactine, la tubuline et la GFAP) (Schmidt et al., 2003) (Cabezas et al., 2005) (Pan et al., 2006). L'extinction de l'expression d'Alix dans la lignée WI38 bloque la formation des fibres de stress et diminue fortement l'interaction entre l'actinine et l'actine F suggérant un rôle essentiel d'Alix dans l'organisation du cytosquelette d'actine (Pan et al., 2006). Des expériences basées sur la dépolymérisation d'actine *in vivo* démontrent une implication de cette protéine, et du cytosquelette qu'elle organise, dans le trafic entre endosomes précoces et endosomes tardifs (Brown and Song, 2001) (Sheff et al., 2002). Au vu de l'interaction d'Alix avec le cytosquelette d'actine, l'équipe de Stenmark a utilisé des siRNA dirigés contre Alix, dans la lignée cellulaire HeLa, pour étudier le rôle potentiel de cette protéine dans l'organisation spatiale des endosomes. En l'absence d'Alix, les endosomes de recyclage ainsi que les endosomes précoces se délocalisent de la périphérie membranaire vers la région périnucléaire (Cabezas et al., 2005). Pour autant, la redistribution de ces endosomes n'affecte pas le recyclage du récepteur à la transferrine ni la dégradation du récepteur à l'EGF (Cabezas





**Figure 27 : La régulation de l'endocytose des récepteurs à l'EGF par Alix, d'après Odorizzi et al 2006.**

A. Alix inhibe l'association du complexe endophiline/CIN85 avec Cbl. Cbl n'a plus la capacité de s'auto-ubiquitiner ni d'ubiquitiner le récepteur et CIN85. Le récepteur ne peut plus être internalisé et sa voie de signalisation n'est plus régulée.

B. En phosphorylant Alix, Src empêche sa liaison au complexe endophilines/CIN85. Ce complexe se retrouve alors libre d'interagir avec Cbl permettant ainsi l'internalisation du récepteur.

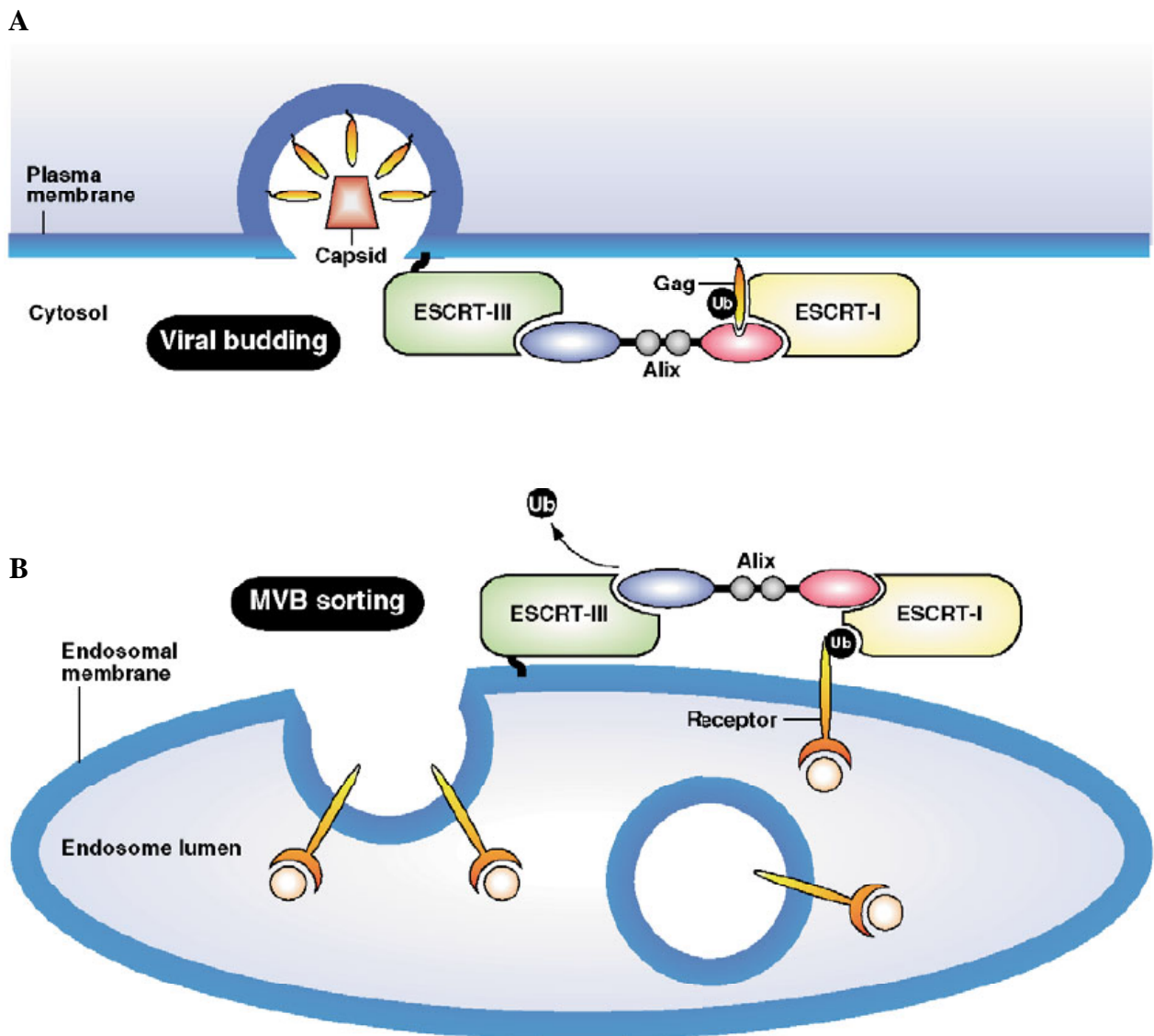
e: endophiline; ub : ubiquitine

et al., 2005). Alix pourrait donc faire un lien entre le cytosquelette via son interaction avec l'actine et la machinerie d'endocytose mais sa fonction précise dans ce processus reste à déterminer.

### **I.3 Alix et le bourgeonnement des virus**

Les virus à ARN ou rétrovirus comme le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), ou le virus de la leucémie murine (VLM), possèdent une enveloppe composée d'une bicouche lipidique qui provient en partie des membranes des cellules à partir desquelles ils ont bourgeonné. Les protéines GAG rétrovirales sont responsables de l'« encapsidation » membranaire et du bourgeonnement des rétrovirus. Plusieurs équipes américaines, dont celle de H.G. Göttlinger et celle de W.I. Sundquist, ont montré que les protéines GAG du VIH sont capables de recruter et d'interagir avec la machinerie de biogénèse des MVBs pour permettre de former le bourgeonnement viral (Strack et al., 2003) (von Schwedler et al., 2003) (**Figure 28**). Cette fixation des GAG peut être directe par Tsg101 du complexe ESCRT-I ou encore par Alix via leur séquence YPXL. Ainsi, Alix et Tsg101 déclenchent la formation d'un échafaudage moléculaire comprenant également les complexes ESCRT-II et ESCRT-III nécessaire au bourgeonnement viral (Strack et al., 2003) (von Schwedler et al., 2003) (Martin-Serrano et al., 2003b) (Martin-Serrano et al., 2005). D'autres virus enveloppés utilisent une stratégie similaire. Ainsi, une augmentation du bourgeonnement du virus de la leucémie murine est observée lors de la surexpression d'Alix (Segura-Morales et al., 2005), au contraire de l'inhibition du bourgeonnement du VIH provoquée par l'expression d'un fragment d'Alix (364-716) (Munshi et al., 2007) (Lee et al., 2007).

Ces travaux montrent que Alix et les complexes ESCRT-I, -II et -III jouent un rôle important dans le bourgeonnement des rétrovirus, comme ils le font dans la formation des petites vésicules internes des endosomes multivésiculaires. D'autre part, l'assemblage des particules virales du VLM se fait sur la membrane des endosomes, avec lesquels elles sont ensuite transportées (Basyuk et al., 2003). Il existe donc un lien entre le système endosomal des cellules hôtes et la biogénèse des rétrovirus (**Figure 28**). D'après ces travaux, Alix semble elle aussi jouer un rôle central dans le bourgeonnement viral en contrôlant le recrutement de la machinerie des ESCRTs.



**Figure 28 : Le détournement de la machinerie des ESCRTs par les virus d'Odorizzi et al 2006.**

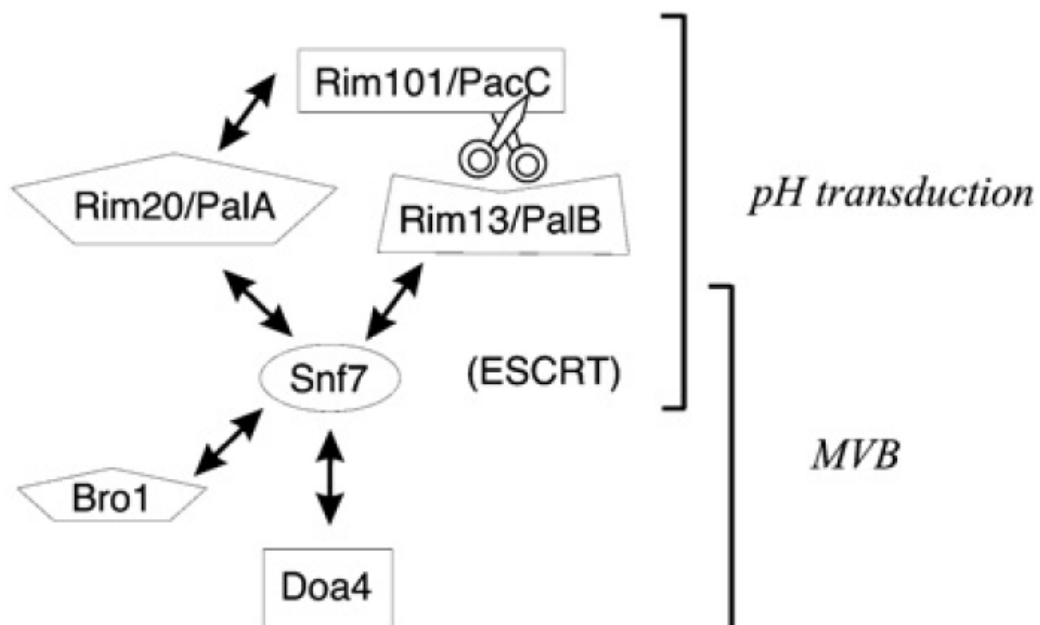
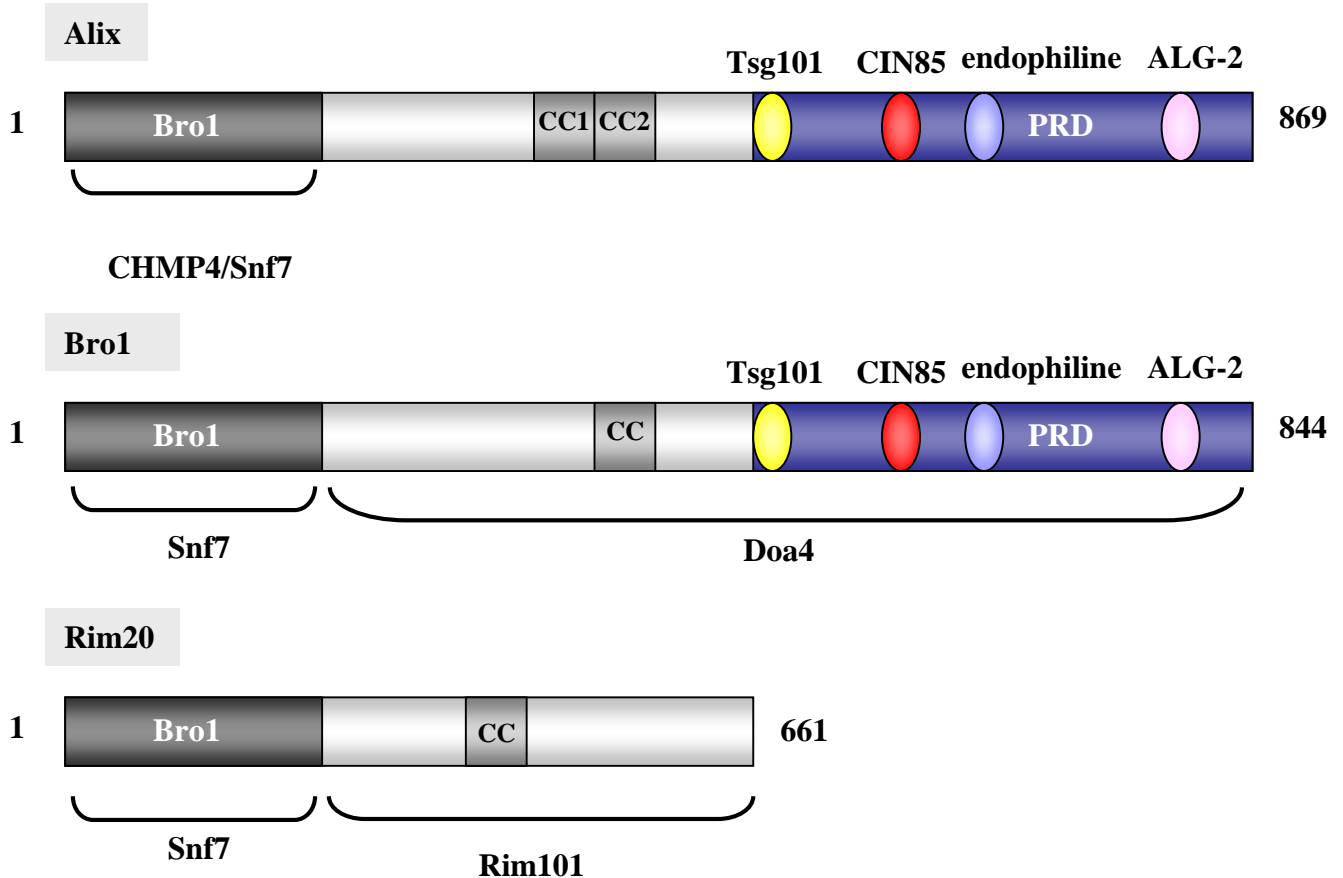
Le bourgeonnement virale à partir de la membrane plasmique (A) est topologiquement similaire au processus de bourgeonnement des vésicules dans la lumière des corps multivésiculés (B). Les protéines GAG virales ubiquitinylées recrutent, à la membrane plasmique, le complexe ESCRT-I pour réaliser le bourgeonnement virale (A). Ces protéines GAG se lient directement à Alix et au complexe ESCRT-I via TSG101. Alix et Tsg101 permettent la formation d'un échaffaudage moléculaire comprenant également les complexes ESCRT-II et ESCRT-III.

#### I.4 Alix : de *Saccharomyces Cerevisiae* aux mammifères

Alix participe à la voie endolysosomale via ses différents partenaires impliqués dans le trafic endosomal, son rôle spécifique dans cette voie reste encore à être déterminé. Différents travaux de recherche chez la levure permettent de compléter les études sur Alix faites chez les mammifères. Alix a deux homologues chez *Saccharomyces Cerevisiae* : Rim20 et Bro1 (Sadoul, 2006).

Rim20, identique à 26% à Alix, a été dans un premier temps caractérisé chez *Aspergillus nidulans* sous le nom de PalA. Cette protéine est impliquée dans la voie de signalisation contrôlant les modifications de pH nécessaires à l'activation de certaines protéines chez la levure. Rim20 contient le domaine Bro1 N-terminal et est homologue à Alix sur toute sa longueur mais ne contient pas la région riche en proline (PRD) dans sa partie C-terminale comme c'est le cas pour Alix ou son homologue Bro1. Rim20 peut se lier à SNF7 au niveau des endosomes permettant le recrutement d'une protéase à cystéine appelée Rim13 mais également le facteur de transcription Rim101. Ceci se produit uniquement si le pH de la cellule est alcalin puisque dans des conditions de pH acide, Rim20 reste uniquement cytosolique et ne peut être recrutée par SNF7. Suite à l'interaction de Rim20 avec SNF7, Rim13 clive la partie C-terminale de Rim101 (Xu and Mitchell, 2001) (**Figure 29**). La forme tronquée de Rim101 peut alors se délocaliser de l'endosome vers le noyau (Lamb et al., 2001) pour aller activer la transcription de gènes exprimés dans des conditions alcalines et réprimer les gènes exprimés dans les conditions acides (Arst and Penalva, 2003). Aucun homologue de Rim101 n'a été identifié à ce jour chez les eucaryotes supérieurs. En revanche, Rim13 est l'homologue de la calpaïne 7 chez les mammifères (Futai et al., 2001). Les calpaïnes sont des protéases à cystéine liant le calcium et faisant partie de la famille des protéines à motifs EF-hand au même titre que la protéine ALG-2. Le rôle de Rim20 pourrait être de permettre à la protéase Rim13 de se retrouver à proximité de son substrat Rim101 (Xu and Mitchell, 2001).

Bro1 contient à la fois le domaine Bro1 d'Alix et son domaine PRD dans sa partie C-terminale. Bro1 a 22% d'identité avec Alix, son homologue mammifère le plus proche. Chez la levure, Bro1 facilite la dé-ubiquitinylation des protéines situées au niveau des corps multivésiculés (Nikko et al., 2003) (Odorizzi, 2006). Bro1, comme Rim20, est recruté sur les endosomes suite à son interaction avec SNF7 (**Figure 25**). Dans un deuxième temps Bro1 va interagir avec Doa4, une ubiquitine thiolestérase (Luhtala and Odorizzi, 2004) (Nikko and



**Figure 29 : Rôle de Bro1 et de Rim20, deux homologues d'Alix, chez la levure.**

A. Représentation schématique d'Alix et de ces deux homologues. Bro1 a une taille et une organisation très proche d'Alix. En revanche, Rim20 ne possède pas de domaine riche en proline (PRD), domaine essentiel pour la majorité des interactions entre Alix et ses partenaires. Bro1 et Rim20 ne possèdent qu'un seul domaine coiled-coiled.

B. Rôle de Rim20 et de Bro1 chez la levure (Sadoul et al 2006).

Andre, 2007) qui catalyse la dé-ubiquitylation des protéines « cargos » juste avant la scission des vésicules intraluminales vers le lumière des corps multivésiculés (Dupre et al., 2001) (Katzmann et al., 2001) (Losko et al., 2001). En l'absence de Bro1, Doa4 n'est plus recruté aux endosomes et n'assure plus sa fonction de dé-ubiquitination, fonction essentielle pour un trafic endosomal normal. Ces résultats suggèrent un rôle essentiel de Bro1 dans le recrutement de Doa4 au niveau des corps multivésiculés. Bro1 pourrait également interagir avec une E3 ubiquitine ligase Rsp5, l'homologue chez la levure de Nedd4 (Springael et al., 2002) (Nikko and Andre, 2007) et régulerait ainsi les cycles d'ubiquitination/dé-ubiquitination, étape clé pour le tri des protéines dans les MVBs.

## **II. Alix et la mort cellulaire**

Alix a été initialement découverte en tant que partenaire d'ALG-2 par criblage double hybride (Missotten et al., 1999), une protéine impliquée dans la mort cellulaire.

ALG-2 semble impliquée dans la mort cellulaire bien que sa fonction précise reste encore inconnue (Chen and Sytkowski, 2005) (Hwang et al., 2002) (Rao et al., 2004). ALG-2 est impliquée dans l'induction de la mort calcium dépendante des cellules T induite par Fas ou les glucocorticoïdes par divers stimuli. L'inhibition d'ALG-2 par un ADN complémentaire antisens, dans ces cellules T, bloque leur mort (Vito et al., 1996). Cependant, ces mêmes cellules T issues de souris mutantes *ALG-2*<sup>-/-</sup> ne sont pas protégées de la mort et se développent normalement, suggérant l'existence d'autres protéines fonctionnellement redondantes (Jang et al., 2002). La surexpression d'ALG-2 sensibilise les fibroblastes à la mort induite par des esters de phorbol ou des ionophores calciques (D'Adamio et al., 1997). Il a été également montré que l'expression d'ALG-2 est augmentée après une ischémie cérébrale focale transitoire (Mollerup et al., 2003). Cependant, l'inhibition de l'expression d'ALG-2 bloque la mort cellulaire sans empêcher l'activation de la caspase 3 suggérant un rôle de la protéine soit en aval de l'activation des caspases soit dans une voie parallèle (Lacana et al., 1997).

ALG-2 est une protéine de 22 kDa appartenant à une famille de protéines PEF (Penta-EF-hand) possédant toutes 5 motifs « EF-hand » (EF1-EF5) (Maki et al., 2002) (**Figure 25**). Ces protéines changent de conformation en présence de calcium et acquièrent la capacité à interagir avec d'autres protéines dont elles régulent la fonction (Jia et al., 2001). ALG-2 lie le calcium au niveau de ses domaines EF1, EF3 et EF5 (Jia et al., 2001). ALG-2 existe sous

deux isoformes chez la souris : ALG-2,5, dont la séquence ADN correspond à celle publiée par Vito et al. et ALG-2,1 dont la séquence ADN est plus courte de 6 nucléotides (Tarabykina et al., 2000). Ces deux isoformes s'associent en homo ou en hétérodimères indépendamment de la présence de calcium. En revanche, l'interaction d'ALG-2 avec Alix est strictement dépendante du calcium (Missotten et al., 1999) et de l'intégrité des domaines EF1 et EF3 d'ALG-2 (Subramanian et al., 2004). ALG-2 se lie à Alix dans le domaine PRD, sur une région PXY composé de 12 acides aminés riche en tyrosine (Trioulier et al., 2004) (Shibata et al., 2004) (**Figure 25**). Seule l'isoforme ALG-2,5 possédant deux acides aminés internes Gly-121 et Phe-122, absents chez ALG-2,1, peut se lier à Alix. Rao et al. ont démontré, dans la lignée cellulaire *Apaf-1<sup>-/-</sup>*, qu'ALG-2 interagit avec la caspase 12 et est nécessaire pour son activation des caspases suite à une augmentation anormale de la concentration en calcium cytosolique (Rao and Bredesen, 2004).

Historiquement, les premiers indices permettant de suggérer le rôle d'Alix dans la mort ont été apportés par Wu et al. qui ont montré que la surexpression de HP95, l'orthologue humain de la protéine Alix, bloque les cellules HeLa en phase G1 et induit leur entrée en apoptose suggérant un rôle potentiel d'Alix dans la mort cellulaire (Wu et al., 2001) (Wu et al., 2002). De plus, CIN85, au départ appelé SETA pour SH3 domain Containing gene Expressed in Tumorigenic Astrocytes, ne semble pas uniquement réguler l'endocytose mais module également la mort cellulaire des astrocytes et des neurones (Chen et al., 2000). En effet, la surexpression de CIN85 dans les astrocytes les sensibilise à la mort induite par les radiations aux ultraviolets et cette activité est corrélée avec la capacité de CIN85 de lier Alix et à ALG-2 (Chen et al., 2000).

Au laboratoire des expériences *in vivo* chez des rats injectés intrapéritonéalement par de l'acide kaïnique ont renforcé l'idée d'un rôle potentiel d'Alix dans la mort cellulaire. Les crises épileptiques déclenchées par l'injection induisent la mort de nombreux neurones dans la région CA1 de l'hippocampe (Hemming et al., 2004). Cette mort est concomitante à une augmentation de l'expression d'Alix dans ces neurones. Une entrée de calcium via les récepteurs au glutamate et une augmentation massive de l'endocytose et de l'autophagie sont décrites au cours de ce processus de mort. Alix est aussi augmentée, chez le rat, dans les neurones du striatum en dégénérescence suite à une intoxication chronique par l'acide 3-nitropropionique (Blum et al., 2004). L'invalidation du gène codant pour Alix, chez *Dictyostelium Discoideum* en état de jeûn, conduit à une différenciation cellulaire partielle et

une morphogénèse anormale suggérant un rôle essentiel d'Alix dans le processus de développement multicellulaire de cet organisme. En revanche, le mutant *Alix*<sup>-/-</sup> est toujours capable de générer des cellules de type tiges qui sont des cellules mortes et vacuolisées suite au déclenchement d'une mort cellulaire programmée ce qui exclut un rôle inducteur de mort pour Alix (Mattei et al., 2005) (Mattei et al., 2006).

Les travaux de thèse de Y. Trioulier au laboratoire ont montré que la surexpression d'Alix, dans les neurones post-mitotiques granulaires de cervelet, est suffisante pour déclencher l'activation des caspases et un mécanisme de neurodégénérescence indépendant des voies des kinases de type c-Jun N-terminal Kinases (JNK) ou ERK (Extracellular signal Regulated Kinase). En revanche, l'expression de la moitié C-terminale d'Alix (*Alix-CT*) dans ces cultures de neurones granulaires est capable de bloquer la mort induite par une déprivation en potassium (Trioulier et al., 2004). ALG-2 se lie à *Alix-CT* au niveau de la séquence PXY. La délétion de ces 12 acides aminés abolit la fonction pro-apoptotique d'Alix et anti-apoptotique d'*Alix-CT*. Ces observations suggèrent que le rôle régulateur d'Alix dans la mort cellulaire passe par sa capacité à interagir avec ALG-2. Yaël Trioulier a observé que l'inhibition de l'activation des caspases dans les neurones granulaires de cervelet déprivés en potassium bloque la destruction du noyau mais ne permet pas d'empêcher la destruction du cytoplasme contrairement à ce qui est observé avec *Alix-CT* (Trioulier et al., 2004). Ces résultats suggèrent que le complexe *Alix/ALG-2* contrôle une étape de mort caspase dépendante mais aussi des mécanismes caspase indépendants enclenchés au cours du programme de la mort neuronal.



# **Résultats et Discussion**

## A. Alix est exprimé dans les axones des motoneurones, *in vivo*, chez l'embryon de poulet

(S Fraboulet, F Hemming, AL Mahul, N Christina, R Sadoul, GEP, 2003)

La mort cellulaire programmée est un processus physiologique par lequel des cellules surnuméraires ou dysfonctionnelles sont éliminées de l'organisme. Elle est donc nécessaire au développement et au maintien du bon fonctionnement de tout organisme vivant puisqu'elle joue un rôle important dans l'embryogenèse, dans l'homéostasie cellulaire, dans le système immunitaire, dans la réparation des tissus mais aussi dans la régression des tumeurs. Par exemple, au cours du développement embryonnaire plus de la moitié des cellules nerveuses meurent naturellement après leur naissance. Une augmentation de la mort cellulaire pourrait être impliquée dans la physiopathologie de nombreux syndromes notamment dans les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, de Parkinson ou la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA). Plusieurs observations ont suggéré que le système endolysosomal pouvait participer à la dégénérescence des neurones (Otomo et al., 2003) (Devon et al., 2006) (Reid et al., 2005) (Skibinski et al., 2005). Notre laboratoire cherche à mettre en évidence de nouveaux acteurs impliqués dans ce processus neurodégénératif. Nous étudions tout particulièrement Alix qui semble impliquée dans la mort cellulaire et qui pourrait également réguler le système endolysosomal.

L'embryon de poulet est un modèle expérimental intéressant dans lequel la mort cellulaire programmée des motoneurones a été particulièrement bien caractérisée (Yaginuma et al., 1996). Dans le but d'utiliser ce modèle expérimental comme modèle d'étude *in vivo* du rôle d'Alix dans la mort cellulaire physiologique au cours du développement embryonnaire nous avons étudié l'expression endogène d'Alix dans l'embryon de poulet à différents stades de son développement.

### © Résultats

Dans un premier temps, nous avons pu montrer que l'anticorps polyclonal du laboratoire dirigé contre la forme murine d'Alix reconnaît aussi la molécule aviaire. Chez l'embryon de poulet, l'expression d'Alix débute dans le neuroépithélium dès le stade 16 HH (selon Hamburger et Hamilton, 1976) correspondant à 2,5 jours de développement. Alix est détectée dans le dermomotome et dans la bordure externe ventrale du tube neural. Nous savons

aujourd'hui que ce marquage périphérique du tube neuronal correspond aux axones des neurones commissuraux qui sont les seuls axones à traverser la plaque du plancher dans le tube neural (résultats non publiés). Alix est également fortement exprimée au niveau des afférences des neurones sensoriels formant le funiculus dorsal au stade 23 HH, soit à 4 jours de développement, mais très peu dans les corps cellulaires au niveau des ganglions dorsaux rachidiens. Nous avons aussi détecté Alix dans le système nerveux autonome, au niveau des ganglions sympathiques à partir du stade 22 HH.

La protéine Alix s'exprime dans les axones des motoneurones dès le début de la pousse axonale, selon un gradient rostro-caudal de maturation du tube neural. Ainsi, au stade 16 HH, Alix est concentrée dans la zone ventrale du tube neural et dans les axones des premiers motoneurones qui projettent vers la périphérie. Son expression devient maximale au stade 24 HH. Puis dans les stades plus tardifs de développement, soit du stade 25 HH au stade 29-30 HH, le marquage ne devient détectable que dans la partie distale des axones à proximité de la cible musculaire des motoneurones.

L'expression endogène d'Alix chez l'embryon de poulet semble transitoire au cours du développement. Son pic d'expression, à 4,5 jours de développement au niveau brachial chez l'embryon de poulet, précède la période de mort naturelle des motoneurones.



# Developmental expression pattern of Alix protein during chick development

**Abstract** Alix (AIP-1) is a member of the AIP family of proteins. It is expressed in the ventral part of the rostral neural tube (stage 16 HH) and then in more caudal parts, the dermomyotome where it becomes restricted to the muscle progenitors. This first demonstration of Alix modulation during development...

## Introduction

Here we report for the first time the developmental expression pattern of Alix protein during chick development. We show by immunocytochemistry that the protein appears first in the ventral part of the rostral neural tube (stage 16 HH) and then in more caudal parts, the dermomyotome where it becomes restricted to the muscle progenitors. This first demonstration of Alix modulation during development...

**Keywords:** Chick embryo; Development; Alix/AIP-1; Polyclonal antibody; Alg-2; Spinal cord; Motoneurons; Axons; Sensory fibres; Dermomyotome; Muscle

## 1. Introduction

The AIP family of proteins is involved in the regulation of gene expression during development.

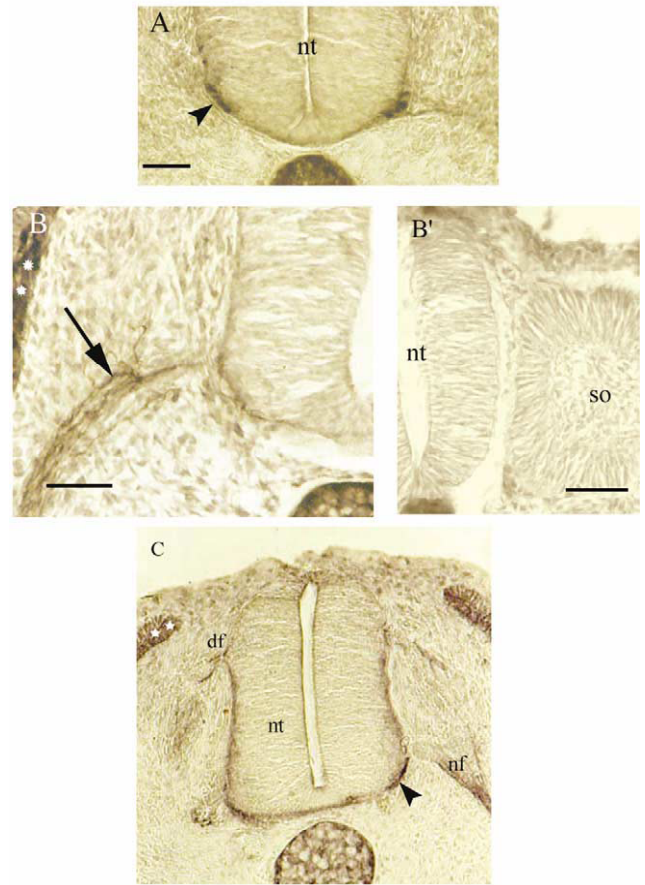
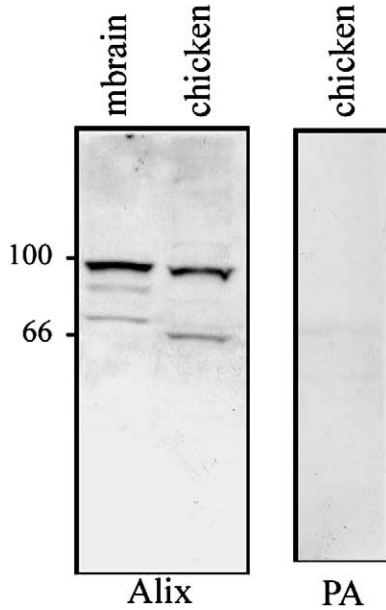
The purified recombinant protein (Y<sub>2</sub>) is used for immunocytochemistry. It is first detected in the ventral part of the rostral neural tube (stage 16 HH) and then in more caudal parts, the dermomyotome where it becomes restricted to the muscle progenitors.

Alix immunoreactivity is first detected in the ventral part of the rostral neural tube (stage 16 HH) and then in more caudal parts, the dermomyotome where it becomes restricted to the muscle progenitors.

The AIP family of proteins is involved in the regulation of gene expression during development. The purified recombinant protein (Y<sub>2</sub>) is used for immunocytochemistry. It is first detected in the ventral part of the rostral neural tube (stage 16 HH) and then in more caudal parts, the dermomyotome where it becomes restricted to the muscle progenitors.

Alix immunoreactivity is first detected in the ventral part of the rostral neural tube (stage 16 HH) and then in more caudal parts, the dermomyotome where it becomes restricted to the muscle progenitors.

Y<sub>2</sub> is a recombinant protein of Alix (AIP-1) used for immunocytochemistry.



Western blot analysis of Alix protein expression. The blot shows two lanes: 'mbrain' and 'chicken'. For Alix, bands are visible at 100 kDa and 66 kDa in the mbrain lane, and at 100 kDa in the chicken lane. For PA, no bands are visible in either lane.

**Expression of Alix in the neural tube and nerve fibers.** Alix is expressed from stage 21–22 HH onwards, in the neural tube and nerve fibers. Immunohistochemical analysis shows Alix-positive fibers in the ventral part of the neural tube and in nerve fibers. Panel A shows a coronal section of the neural tube (nt) with an arrow pointing to Alix-positive fibers. Panel B shows a longitudinal section of the neural tube with an arrow pointing to Alix-positive fibers and an asterisk indicating a region of strong expression. Panel B' is a higher magnification of the region in B, showing the neural tube (nt) and somites (SO). Panel C shows a coronal section with labels for dorsal fin (df), neural tube (nt), and nerve fibers (nf), with an arrow pointing to Alix-positive fibers.

**Location of Alix in the neural tube and nerve fibers.** Alix is expressed from stage 21–22 HH onwards, in the neural tube and nerve fibers. Immunohistochemical analysis shows Alix-positive fibers in the ventral part of the neural tube and in nerve fibers.

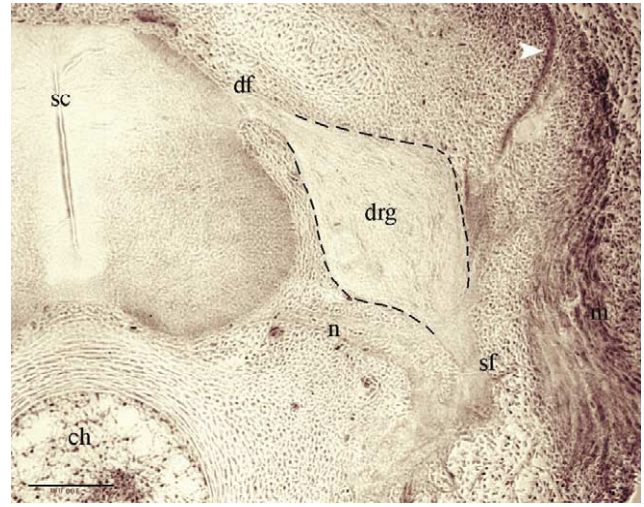
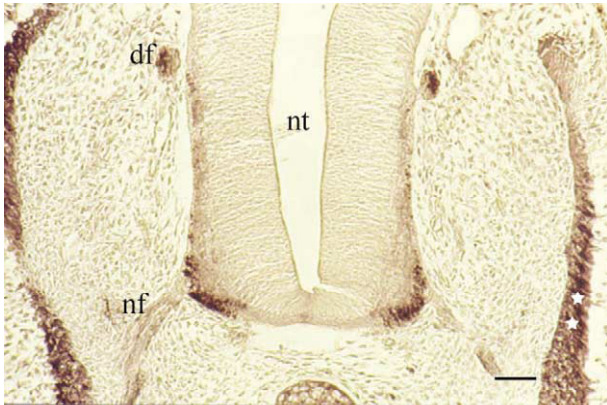
**Expression of Alix in the neural tube and nerve fibers.** Alix is expressed from stage 21–22 HH onwards, in the neural tube and nerve fibers. Immunohistochemical analysis shows Alix-positive fibers in the ventral part of the neural tube and in nerve fibers.

**Location of Alix in the neural tube and nerve fibers.** Alix is expressed from stage 21–22 HH onwards, in the neural tube and nerve fibers. Immunohistochemical analysis shows Alix-positive fibers in the ventral part of the neural tube and in nerve fibers.

**Expression of Alix in the neural tube and nerve fibers.** Alix is expressed from stage 21–22 HH onwards, in the neural tube and nerve fibers. Immunohistochemical analysis shows Alix-positive fibers in the ventral part of the neural tube and in nerve fibers.

**Figure 1.** Alix expression in the neural tube and nerve fibers. (A) Coronal section of the neural tube (nt) showing Alix-positive fibers (arrow). (B) Longitudinal section of the neural tube showing Alix-positive fibers (arrow) and a region of strong expression (asterisk). (B') Higher magnification of the region in B, showing the neural tube (nt) and somites (SO). (C) Coronal section showing Alix-positive fibers (arrow) in the ventral part of the neural tube (nt) and in nerve fibers (nf). df, dorsal fin.

Figure 1. Alix expression in the neural tube and nerve fibers. (A) Coronal section of the neural tube (nt) showing Alix-positive fibers (arrow). (B) Longitudinal section of the neural tube showing Alix-positive fibers (arrow) and a region of strong expression (asterisk). (B') Higher magnification of the region in B, showing the neural tube (nt) and somites (SO). (C) Coronal section showing Alix-positive fibers (arrow) in the ventral part of the neural tube (nt) and in nerve fibers (nf). df, dorsal fin.



Ú.1ò íð Ì0¿.2.2±0- ->½±2 ±0 ¿ -¿1» íí 00 ½.¼µ » 3%0S± ¿-¿, » '« 3¼¿0  
 '»a»ñ x 3 3 «2±0¿½.2.2±0- ->½±2 ±0 ¿ -¿1» ±0 ¼»a»±0 3 2¿ ¿2¼  
 0¿½.¿- ¿, » ½¿¼¿0 1.±2 ±0 ¿, » 2»0¿' -¿¼»ò ß'." -- -0±21'S » °00»-->¼  
 a¿2.0¿'S.2.¿, » 2»0¿' -¿¼»ò 02¿¿¿2¼ ¿'±.2.¿, » ->2.±0S ¿00»2-0±0 3.21.¿, »  
 ¼±0-¿'0«2.¼«-0¼0±ò Ì, » ¼»0 3 ±3 S±± 3 ¿' ¼' -¿0» ¼¿¿0'S -¿.2»¼ 0-¿0±ò±ò  
 nf, nerve fibres. Bar, 50 3 3 ò

Ú.1ò èò ß'." » °00»--±2 ¿-¿1» íð 00 ½¿2 ¼» ¼»»¼»¼.2.¿, » 3 ±±0 2»0a»-  
 ¿.¿2 ¿-¿¿0'»0 -¿1»-ò ß --0±21. 3 3 «2±0¿½.2.2±0- ->½±2 ±0 ¿ -¿1» »  
 0¿ 3 «-¼±0-¿'-0¿, -¿) ¿00±0¿¿¼¿¿¿2¼.2.¿, » ¼.00»002-¿-¿.21 3 «-¼' ½¿' -ò Ì¼ò  
 -0.2¿ ¼±0¼¼ ¼0¿ ¼±0-¿' 0«2.¼«-¿ 2¿ -0.2¿' 2»0a»ò 3 ¿ 3 «-¼'¿-¿ -0¿ ->2-±0S  
 fibres; ch, chord. Bar, 100 3 3 ò

íð Ò"°0. 3 » 2-¿' °0±½¼«0»-

Ú0»-.'!¼ ½.¼µ»2 » 11- ©00» .2¼¼¿¿¼¼ ¿ íè °Ý.2 ¿  
 humidified atmosphere. Embryos were staged according to  
 0¿ 3¼«01»0¿¿2¼ 0¿ 3.'±2 0¿ç¿¿ and fixed overnight at 4 °Y  
 .2 Ì Ò °¿0¿0±0 3 ¿¼» S¼»ò ðòíí Ó °.±°.¿-¿, » ¼«00»00 ðòíí  
 3 ÓÝ¿Ý¿ò Ì Ò -¼0±-»ò ß0»00 ©¿¿.21.2 ðòíí Ó °.±°.¿-¿, »  
 ¼«00»00 ½±2-¿.2.21 íè Ò -¼0±-» 0±0 ¿' ¿-¿ Ì Ò, ¿-¿ Ì °Ýò ¿, »

» 3¼0S±- ©00» » 3¼¼¼¼¼.2 èòè Ò 1¿¿-¿¿ ¿2¼ 00±!¿2 .2  
 2.-0±1¿2¼.¿'¼ -±0°2-¿¿¿ 0±0 í 3.2 ¿-êè °Ýò Ì¼0¿¿'  
 sections (10–15 3 3 ÷ ©00» ½«¿ ©-¿, ¿ ¼0S±-¿¿¿2¼ -¿±0¼¼¼ ¿-  
 -íð °Ý¼0±0¼¼.21 «-»¼ò  
 x 3 3 «2±-¿.2.21 ±0 ->½±2- ©¿- °00±0 3 ¼¼ ©-¿, ß'."ò

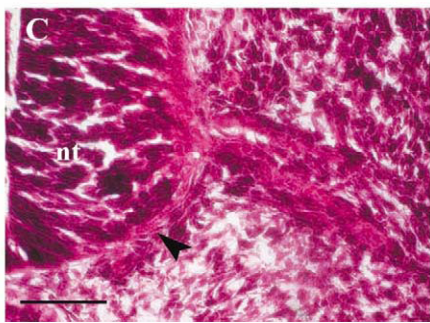
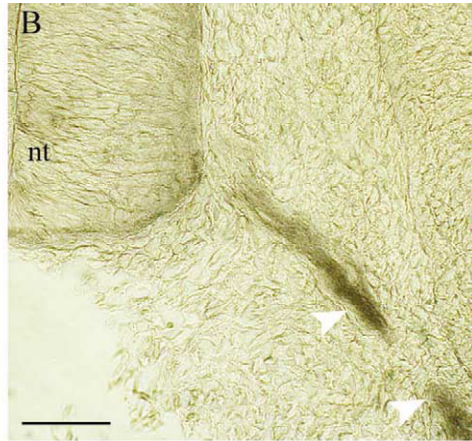
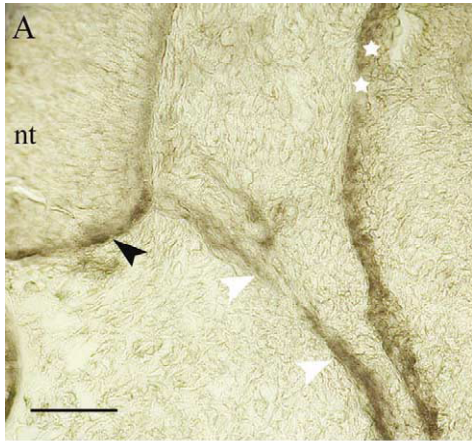


Fig. 4. Anti-Alix polyclonal antibody (A) stains fibres similar to those stained with a Tau-1 monoclonal antibody in an adjacent section (B) but does not co-expressing Tau-1 and Alix proteins. The black arrowhead points to the ventral fibres expressing Alix in the neural tube. Bar, 50 3 3 ò



## **B. Alix, un lien entre la voie endolysosomale et la mort cellulaire, *in vivo*, dans les motoneurones**

(AL Mahul-Mellier, F Hemming, S Fraboulet, R Sadoul, J Neurosciences, 2006)

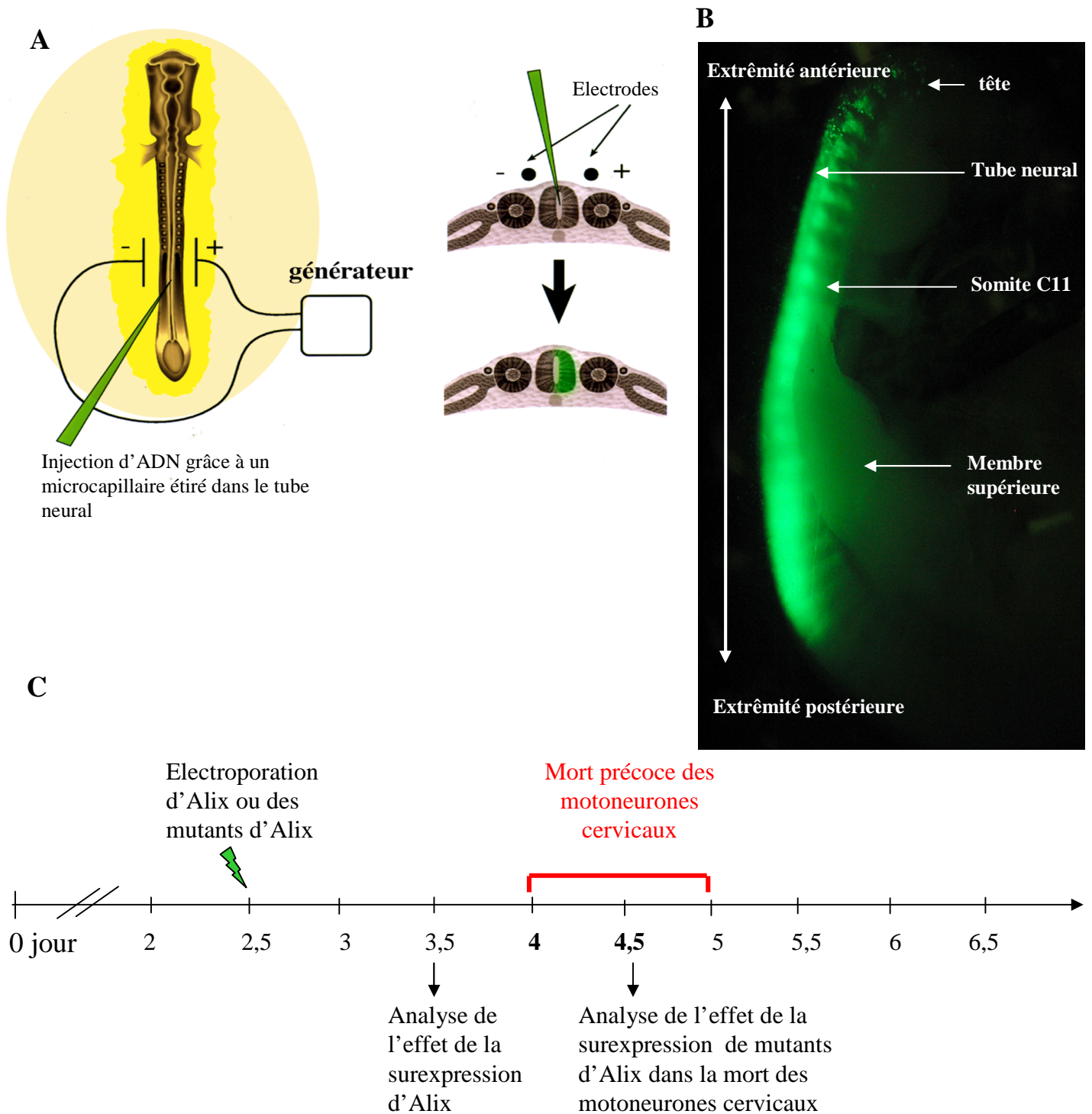
L'expression spatio-temporelle spécifique d'Alix dans le tube neural de l'embryon de poulet nous a conduit à essayer de modifier cette expression, *in vivo*, afin d'en étudier les conséquences sur la mort des motoneurones au cours du développement. Pour se faire, nous avons mis au point, avec Sandrine Fraboulet, une technique de transfection *in vivo* par électroporation permettant de surexprimer efficacement des protéines dans le tube neural d'embryons de poulet (**Figure 30 A-B**). Cette technique a l'avantage d'aboutir à une expression unilatérale de la protéine d'intérêt. Le côté « non électroporé » devenant en même temps un témoin interne pour l'expérience. Nos différentes constructions sont clonées dans un vecteur d'expression pCAGGS contenant le promoteur  $\beta$ -actine aviaire sous le contrôle d'un enhancer de type CMV. Les embryons sont tous électroporés à 2,5 jours de développement puis récupérés pour l'analyse 24 ou 48 heures après la transfection (**Figure 30 C**).

### © Résultats

#### **1. La surexpression d'Alix dans le tube neural d'embryon de poulet est suffisante pour induire la mort, *in vivo*, des cellules neuroépithéliales**

Nos premiers résultats ont montré que la surexpression d'Alix sauvage dans le neuroépithélium embryonnaire est suffisante pour provoquer une diminution de l'épaisseur du neuroépithélium, dès 24 heures après la transfection. L'effet d'Alix induit parfois une forte déformation, visible 48 heures après l'électroporation. Dans ces conditions, la différence d'épaisseur de la paroi du tube neural peut s'expliquer essentiellement par une diminution du nombre de cellules. L'évaluation du taux de prolifération des cellules du neuroépithélium, estimée par l'incorporation de BrdU, montre clairement que la surexpression d'Alix dans ces cellules ne bloque pas leur capacité à se diviser. En revanche, certains noyaux des cellules surexprimant Alix présentent des modifications morphologiques visibles par coloration au Hoechst : marginalisation puis condensation de la chromatine et fragmentation de l'ADN. L'analyse quantitative, réalisée après le marquage des noyaux par la technique du TUNEL, a confirmé que la surexpression d'Alix entraîne une mort cellulaire massive des cellules





**Figure 30 : Technique d'électroporation in vivo chez l'embryon de poulet.**

A. Une solution d'ADN plasmidique est injectée, à l'aide d'un microcapillaire, dans le tube neural d'embryon de poulet à 2,5 jours de développement. Un choc électrique est créé par l'intermédiaire de deux électrodes reliées à un générateur créant des pulses carrés et placées de part et d'autre du tube neural. L'ADN, chargé négativement, pénètre dans les cellules du tube neural de façon unidirectionnelle. Le côté non électroporé est excellent contrôle interne.

B. Vue de profil d'un embryon de poulet du côté transfecté par de l'ADN codant pour le GFP. La GFP s'exprime dans le tube neural de cet embryon de poulet à 4,5 jours soit 48 heures après l'électroporation.

C. Echelle de temps représentant notre protocole expérimental d'électroporation des embryons de poulet.

neuroépithéliales dès 24 heures après la transfection. Cette capacité d'Alix à induire la mort est dépendante de son interaction avec la protéine ALG-2. En effet, un mutant d'Alix déléte des 12 acides aminés nécessaire à l'interaction avec ALG-2 (Alix $\Delta$ ALG-2) n'entraîne plus la mort des cellules neuroépithéliales.

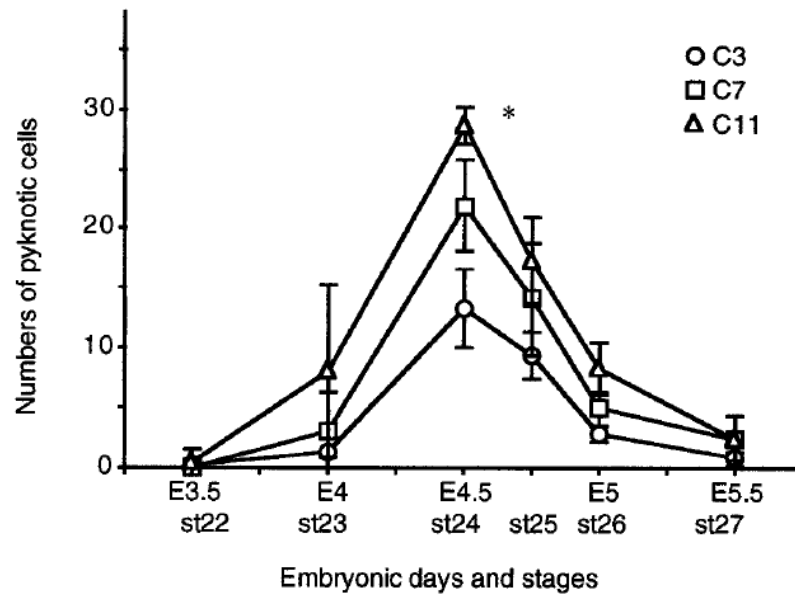
Nos expériences *in vivo* confirment les résultats obtenus *in vitro* qui avaient démontré le rôle pro-apoptotique d'Alix surexprimé dans des neurones granulaires du cervelet de souris en culture (Trioulier et al., 2004).

## **2. Alix-CT protège efficacement les motoneurones cervicaux de la mort cellulaire précoce**

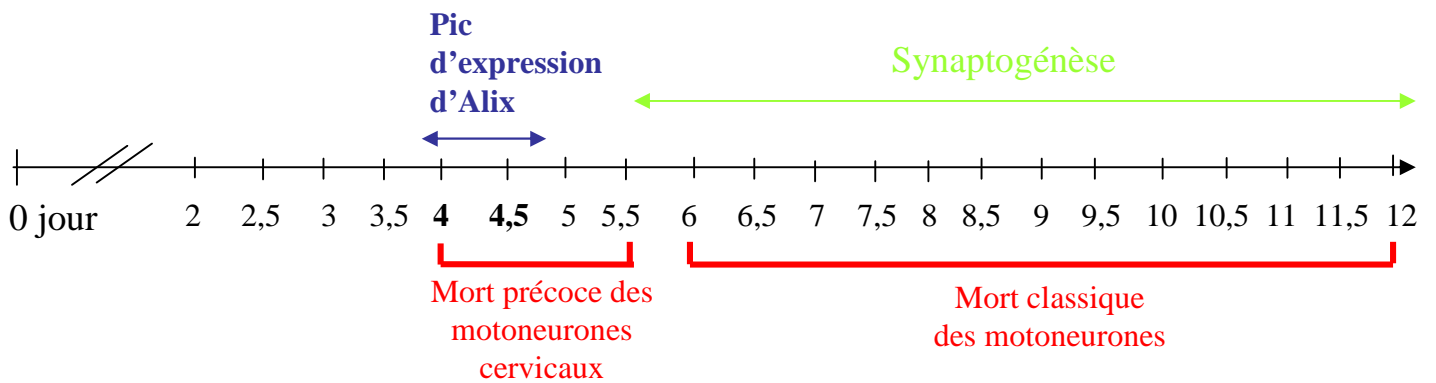
Nous avons voulu tester l'effet des mutants d'Alix sur un modèle de mort naturelle développementale. Le pic d'expression endogène d'Alix précède de peu la période de mort naturelle des motoneurones situés dans la région cervicale (**Figure 31B**). Chez l'embryon de poulet, cette mort se déroule entre le 4<sup>ème</sup> et le 5<sup>ème</sup> jours embryonnaire, avant l'établissement du contact entre les motoneurones et leurs cibles musculaires, et entraîne la perte de 25 à 30% des motoneurones cervicaux (Yaginuma et al., 1996) (**Figure 31A**). Alix pourrait donc potentiellement jouer un rôle dans ce processus de neurodégénérescence.

En se basant sur les résultats *in vitro* de Trioulier et al, nous avons utilisé la moitié C-terminale d'Alix (Alix-CT) qui contient toujours le domaine PRD nécessaire à l'essentiel des interactions d'Alix avec ses partenaires (Trioulier et al., 2004). Le plasmide codant pour ce mutant est électroporé à 2,5 jours dans le tube neural de l'embryon. La partie cervicale (C8-C11) des embryons de poulet est récupérée à 4,5 jours, au moment où le nombre des motoneurones cervicaux en train de mourir est à son maximum (**Figures 30C et 31**). L'effet d'Alix-CT sur la mort de ces motoneurones est analysé quantitativement par la technique du TUNEL, permettant de marquer spécifiquement les cellules dont l'ADN est en voie de fragmentation. Nous avons montré qu'Alix-CT réduit de moitié le nombre de cellules TUNEL positives. Pour s'assurer qu'Alix-CT a réellement un effet protecteur, nous avons quantifié le nombre de motoneurones survivants, à 5,5 jours, une fois la période de mort cervicale achevée. L'immunomarquage de la protéine Islet-1, un marqueur spécifique des motoneurones, a mis en évidence la présence de motoneurones surnuméraires du côté du tube neural surexprimant Alix-CT, démontrant ainsi un réel pouvoir protecteur de ce mutant sur la mort précoce des motoneurones cervicaux.

A



B



**Figure 31 : La mort naturelle des motoneurones.**

A. Echelle spatio-temporelle décrivant la mort naturelle des motoneurones dans le 3ème, le 7ème et le 11ème segment cervical (d'après Yaginuma et al 1996). La perte maximale de motoneurones se situe dans le segment C11 à 4,5 jours de développement.

B. Le pic d'expression d'Alix précède le début de la mort « classique » des motoneurones mais a lieu exactement pendant la mort précoce des motoneurones cervicaux.

### **3. Le complexe Alix/ALG-2 et les ESCRTs sont impliqués dans la mort cervicale des motoneurones**

Pour comprendre le rôle protecteur d'Alix-CT, nous avons délété dans son domaine PRD les principaux domaines de liaison nécessaires à son interaction avec ses différents partenaires. Alix-CT n'est plus capable de protéger les motoneurones cervicaux de leur mort suite à la délétion de ses sites de liaison avec ALG-2 (P<sup>802</sup>XYP<sup>813</sup>) ou avec TSG101 (P<sup>717</sup>SAP<sup>720</sup>). En revanche, la délétion des 14 acides aminés impliqués dans l'interaction d'Alix-CT avec les endophilines (P<sup>748</sup>xRPPPP<sup>761</sup>) ne modifie en rien son effet protecteur. Alix-CT ne possède plus de domaine BRO1, nécessaire à sa liaison avec la protéine CHMP4b du complexe ESCRT-III. L'absence d'interaction entre Alix-CT et CHMP4b pourrait être à l'origine de l'effet protecteur de ce mutant. Pour tester cette hypothèse, j'ai utilisé un mutant d'Alix uniquement délété de son domaine BRO1. Alix $\Delta$ BRO1 protège comme Alix-CT les motoneurones de la mort.

Nous avons pu mettre en évidence une capacité du mutant Alix $\Delta$ ALG-2 à réduire tout aussi efficacement qu'Alix-CT le nombre de cellules TUNEL positives à 4,5 jours dans la région cervicale. En revanche, la délétion supplémentaire, dans le mutant Alix $\Delta$ ALG2, des 4 acides aminés nécessaires à son interaction avec TSG101, du complexe ESCRT-I, abolit totalement son effet protecteur.

#### **© Discussion**

J'ai pu montrer que la surexpression d'Alix induit la mort des cellules neuroépithéliales à condition de pouvoir interagir avec ALG-2. En revanche, Alix-CT et Alix $\Delta$ BRO1, qui ne peuvent plus se lier à ESCRT-III, protègent les motoneurones de leur mort naturelle. Alix $\Delta$ ALG-2 a également un effet protecteur. Dès qu'un mutant présente une incapacité d'interaction avec un de ses partenaires, que ce soit ESCRT-I, ESCRT-III ou ALG-2, il acquiert un effet protecteur lui permettant d'inhiber la mort naturelle des motoneurones. Ces mutants se conduiraient en dominants négatifs bloquant le système qui est impliqué dans le déroulement physiologique de la mort et impliquant Alix, ALG-2 et les complexes I et III des ESCRTs. En revanche, la double mutation de la liaison à ALG-2 et au complexe I des ESCRTs abolit l'effet dominant négatif. Nous montrons de concert avec ces résultats l'implication du complexe Alix/ALG-2 avec les protéines ESCRT dans la mort naturelle des motoneurones cervicaux.

Notre démonstration a été appuyée par deux publications simultanées très intéressantes démontrant l'existence d'une relation entre des dysfonctionnements endosomaux et des pathologies neurodégénératives. Des mutations dans le gène CHMP2b, membre du complexe ESCRT-III, sont à l'origine de démences fronto-temporales dans une famille danoise ainsi que de deux cas de Sclérose Latérale Amyotrophique (ALS), (Devon et al., 2006) (Skibinski et al., 2005). Au laboratoire, Yves Goldberg et son étudiante en thèse Agnès Belly, ont constaté que dans des cellules transfectées par CHMP2b, celle-ci s'accumule dans des compartiments vésiculaires anormaux, contenant des marqueurs d'endosomes tardifs. CHMP2b, de part son interaction avec la voie endocytaire et son implication dans la neurodégénérescence neuronale paraît être un autre bon candidat pour continuer de disséquer le lien entre les ESCRTs et la mort neuronale. Notre modèle de mort *in vivo* chez l'embryon de poulet paraît bien adapté pour étudier physiologiquement le mécanisme d'action de cette protéine ou de ses mutants.

En parallèle, pour mieux comprendre *in vivo* comment les protéines ESCRTs peuvent contrôler la mort des motoneurones, nous pourrions caractériser les protéines pouvant interagir avec le complexe Alix/ALG-2 en utilisant une analyse par spectrométrie de masse en collaboration avec J. Garin (Grenoble) d'immunoprécipitats réalisés à partir d'extraits de tubes neuraux. Nous pourrions ainsi caractériser des partenaires nouveaux permettant d'expliquer les effets que nous observons.

Enfin, l'obtention de systèmes efficaces d'extinction de l'expression de ces gènes *in ovo* serait un atout supplémentaire à notre travail. Nous avons déjà tenté différentes approches *in vivo*. L'électroporation de longs doubles brins d'ARN appelé dsRNA est efficace mais peu reproductible sur un grand nombre d'échantillons. L'électroporation du vecteur pSUPER codant pour des shRNA dirigés contre Alix ne nous ont pas permis de baisser significativement l'expression d'Alix. En revanche, l'extinction d'ALG-2 semblait efficace mais s'accompagnait de la mort des cellules du neuroépithélium. Nous n'avons aujourd'hui aucun élément pour démontrer que cet effet était spécifique à la baisse d'ALG-2. Nous souhaitons continuer ces expériences en transfectant directement des siRNA dirigés contre Alix ou les ESCRTs dans le tube neural d'embryon de poulet.

D'autre part, la mise en lumière du rôle d'Alix dans la mort des motoneurones appelle immédiatement la question de savoir si cette protéine est un nouvel effecteur de la machinerie de destruction de la cellule et/ou un maillon dans la voie de signalisation d'un récepteur tel

que les récepteurs à dépendance, les récepteurs neurotrophiques ou les récepteurs de mort. L'utilisation d'autres mutants d'Alix et d'Alix-CT, par exemple délété de leur site d'interaction avec CIN85, un des partenaires d'Alix impliqué dans l'endocytose de récepteurs membranaires, nous a permis de poursuivre notre étude.







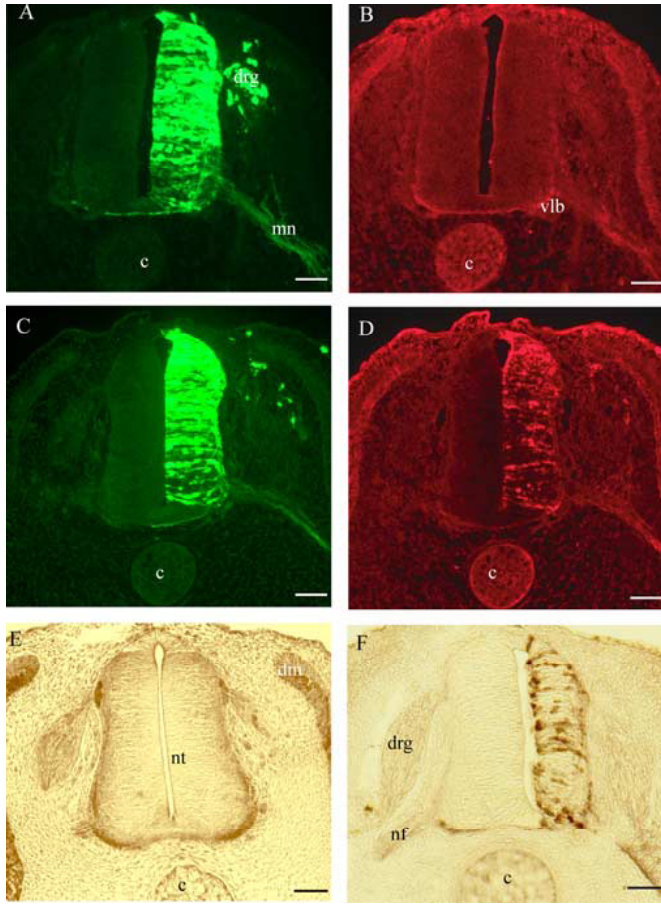


Figure 1 shows the localization of the protein in the nervous system of the embryo. Panels A and C show the localization in the dorsal root ganglion (drg) and marginal nerve (mn). Panels B and D show the localization in the ventral root ganglion (vib). Panels E and F show the localization in the neural tube (nt), dorsal root ganglion (drg), and nerve fiber (nf).

Figure 1. Localization of the protein in the nervous system of the embryo. Panels A and C show the localization in the dorsal root ganglion (drg) and marginal nerve (mn). Panels B and D show the localization in the ventral root ganglion (vib). Panels E and F show the localization in the neural tube (nt), dorsal root ganglion (drg), and nerve fiber (nf).

**Figure 2** shows the localization of the protein in the nervous system of the embryo. Panels A and C show the localization in the dorsal root ganglion (drg) and marginal nerve (mn). Panels B and D show the localization in the ventral root ganglion (vib). Panels E and F show the localization in the neural tube (nt), dorsal root ganglion (drg), and nerve fiber (nf).

Figure 2 shows the localization of the protein in the nervous system of the embryo. Panels A and C show the localization in the dorsal root ganglion (drg) and marginal nerve (mn). Panels B and D show the localization in the ventral root ganglion (vib). Panels E and F show the localization in the neural tube (nt), dorsal root ganglion (drg), and nerve fiber (nf).

Figure 3 shows the localization of the protein in the nervous system of the embryo. Panels A and C show the localization in the dorsal root ganglion (drg) and marginal nerve (mn). Panels B and D show the localization in the ventral root ganglion (vib). Panels E and F show the localization in the neural tube (nt), dorsal root ganglion (drg), and nerve fiber (nf).

Figure 4 shows the localization of the protein in the nervous system of the embryo. Panels A and C show the localization in the dorsal root ganglion (drg) and marginal nerve (mn). Panels B and D show the localization in the ventral root ganglion (vib). Panels E and F show the localization in the neural tube (nt), dorsal root ganglion (drg), and nerve fiber (nf).

Figure 5 shows the localization of the protein in the nervous system of the embryo. Panels A and C show the localization in the dorsal root ganglion (drg) and marginal nerve (mn). Panels B and D show the localization in the ventral root ganglion (vib). Panels E and F show the localization in the neural tube (nt), dorsal root ganglion (drg), and nerve fiber (nf).

Figure 6 shows the localization of the protein in the nervous system of the embryo. Panels A and C show the localization in the dorsal root ganglion (drg) and marginal nerve (mn). Panels B and D show the localization in the ventral root ganglion (vib). Panels E and F show the localization in the neural tube (nt), dorsal root ganglion (drg), and nerve fiber (nf).



by half by GFP-Alix-CT expression (Figs. 8B, 9C).  $\Delta\text{ALG-2}$  mutation (Fig. 8B) also significantly reduced the number of motoneurons in the abdominal ganglion (Fig. 8B). The  $\Delta\text{ALG-2}$  mutation also significantly increased the number of motoneurons in the abdominal ganglion (Fig. 8B). The  $\Delta\text{ALG-2}$  mutation also significantly increased the number of motoneurons in the abdominal ganglion (Fig. 8B).

The  $\Delta\text{ALG-2}$  mutation also significantly increased the number of motoneurons in the abdominal ganglion (Fig. 8B). The  $\Delta\text{ALG-2}$  mutation also significantly increased the number of motoneurons in the abdominal ganglion (Fig. 8B). The  $\Delta\text{ALG-2}$  mutation also significantly increased the number of motoneurons in the abdominal ganglion (Fig. 8B).

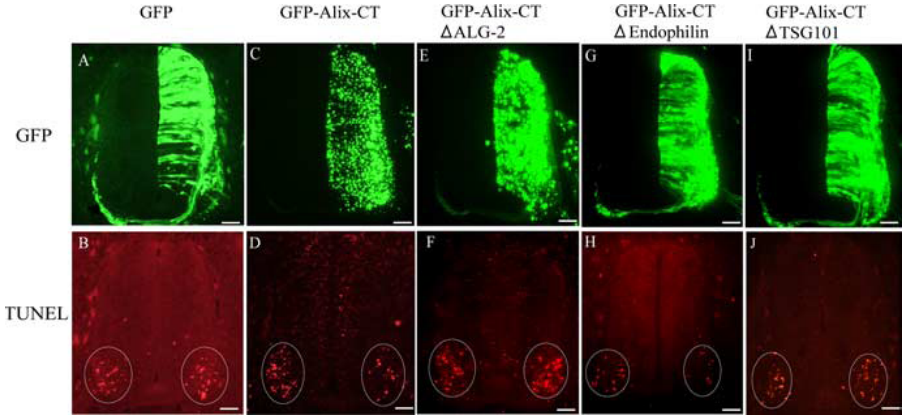


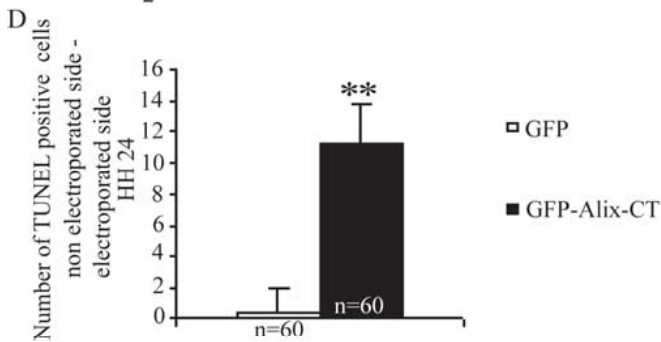
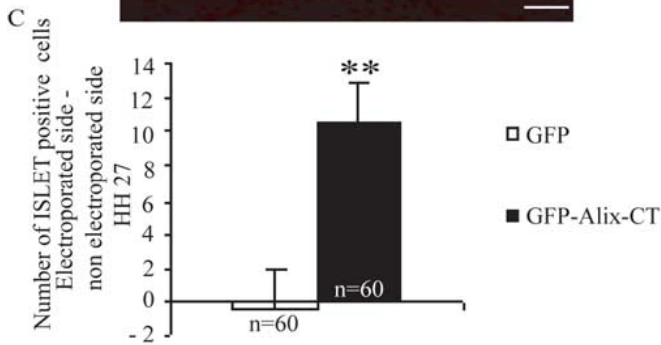
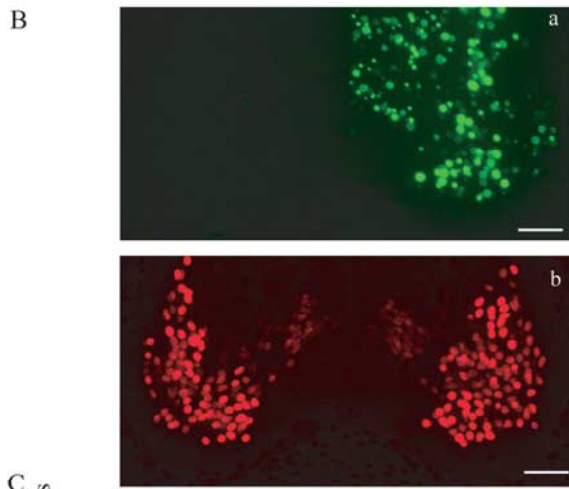
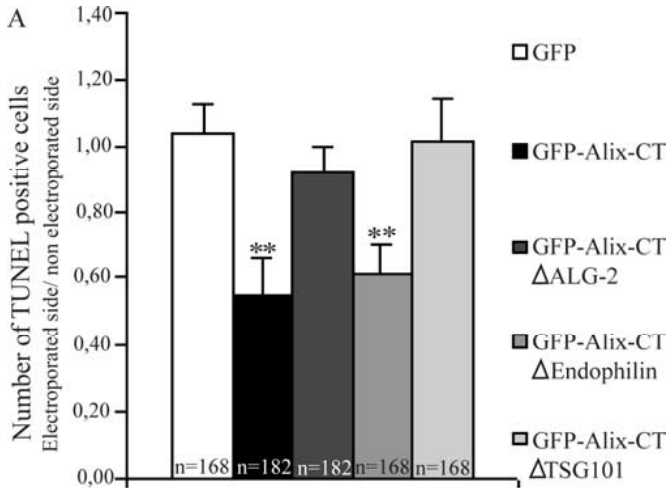
Figure 8. Expression of GFP-Alix-CT and its mutants in the abdominal ganglion motoneurons. *A*, *E*, GFP expression in the abdominal ganglion motoneurons. *B*, *F*, Expression of GFP-Alix-CT. *C*, *G*, Expression of GFP-Alix-CT  $\Delta\text{ALG-2}$ . *D*, *H*, Expression of GFP-Alix-CT  $\Delta\text{Endophilin}$ . *E*, *J*, Expression of GFP-Alix-CT  $\Delta\text{TSG101}$ . *F*, *K*, TUNEL staining of motoneurons in the abdominal ganglion. *G*, *L*, TUNEL staining of motoneurons in the abdominal ganglion of GFP-Alix-CT  $\Delta\text{ALG-2}$  mutant. *H*, *M*, TUNEL staining of motoneurons in the abdominal ganglion of GFP-Alix-CT  $\Delta\text{Endophilin}$  mutant. *I*, *N*, TUNEL staining of motoneurons in the abdominal ganglion of GFP-Alix-CT  $\Delta\text{TSG101}$  mutant. *J*, *O*, Merged images of GFP and TUNEL staining. *K*, *P*, Merged images of GFP-Alix-CT  $\Delta\text{ALG-2}$  and TUNEL staining. *L*, *Q*, Merged images of GFP-Alix-CT  $\Delta\text{Endophilin}$  and TUNEL staining. *M*, *R*, Merged images of GFP-Alix-CT  $\Delta\text{TSG101}$  and TUNEL staining. Scale bars, 10  $\mu\text{m}$ .

The number of motoneurons in the abdominal ganglion was significantly reduced in GFP-Alix-CT  $\Delta\text{ALG-2}$  mutant compared with GFP-Alix-CT (Fig. 8B). This reduction was significantly rescued in GFP-Alix-CT  $\Delta\text{ALG-2}$   $\Delta\text{TSG101}$  mutant (Fig. 8C). The  $\Delta\text{Endophilin}$  mutant (Fig. 8D) also significantly reduced the number of motoneurons in the abdominal ganglion, but this reduction was not significantly rescued in GFP-Alix-CT  $\Delta\text{Endophilin}$   $\Delta\text{TSG101}$  mutant (Fig. 8E). The  $\Delta\text{TSG101}$  mutant (Fig. 8E) also significantly reduced the number of motoneurons in the abdominal ganglion, but this reduction was not significantly rescued in GFP-Alix-CT  $\Delta\text{TSG101}$  mutant (Fig. 8F).

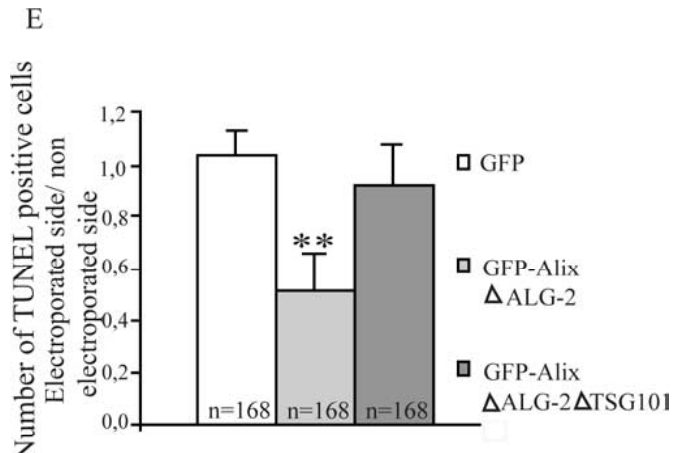
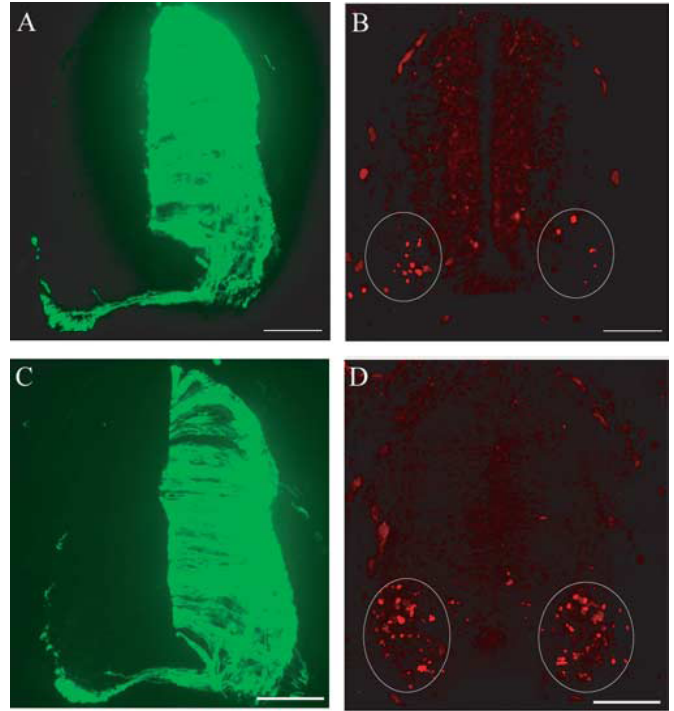
### Uy et al. • ATRX and TSG101 Suppress Tumorigenesis in *Drosophila*

The number of motoneurons in the abdominal ganglion was significantly reduced in GFP-Alix-CT  $\Delta\text{ALG-2}$  mutant compared with GFP-Alix-CT (Fig. 8B). This reduction was significantly rescued in GFP-Alix-CT  $\Delta\text{ALG-2}$   $\Delta\text{TSG101}$  mutant (Fig. 8C). The  $\Delta\text{Endophilin}$  mutant (Fig. 8D) also significantly reduced the number of motoneurons in the abdominal ganglion, but this reduction was not significantly rescued in GFP-Alix-CT  $\Delta\text{Endophilin}$   $\Delta\text{TSG101}$  mutant (Fig. 8E). The  $\Delta\text{TSG101}$  mutant (Fig. 8E) also significantly reduced the number of motoneurons in the abdominal ganglion, but this reduction was not significantly rescued in GFP-Alix-CT  $\Delta\text{TSG101}$  mutant (Fig. 8F).

The number of motoneurons in the abdominal ganglion was significantly reduced in GFP-Alix-CT  $\Delta\text{ALG-2}$  mutant compared with GFP-Alix-CT (Fig. 8B). This reduction was significantly rescued in GFP-Alix-CT  $\Delta\text{ALG-2}$   $\Delta\text{TSG101}$  mutant (Fig. 8C). The  $\Delta\text{Endophilin}$  mutant (Fig. 8D) also significantly reduced the number of motoneurons in the abdominal ganglion, but this reduction was not significantly rescued in GFP-Alix-CT  $\Delta\text{Endophilin}$   $\Delta\text{TSG101}$  mutant (Fig. 8E). The  $\Delta\text{TSG101}$  mutant (Fig. 8E) also significantly reduced the number of motoneurons in the abdominal ganglion, but this reduction was not significantly rescued in GFP-Alix-CT  $\Delta\text{TSG101}$  mutant (Fig. 8F).



Όξεία υποξυγεία στον εγκέφαλο προκαλεί την έκφραση της αλιξίνης και την ενεργοποίηση του μονοκλωνικού αντισώματος anti-Alox-CT. Η έκφραση της αλιξίνης είναι ανεπάρκτη στην υποξυγεία, ενώ η έκφραση της αλιξίνης είναι αυξημένη στην υποξυγεία. Η έκφραση της αλιξίνης είναι ανεπάρκτη στην υποξυγεία, ενώ η έκφραση της αλιξίνης είναι αυξημένη στην υποξυγεία.



Όξεία υποξυγεία στον εγκέφαλο προκαλεί την έκφραση της αλιξίνης και την ενεργοποίηση του μονοκλωνικού αντισώματος anti-Alox-CT. Η έκφραση της αλιξίνης είναι ανεπάρκτη στην υποξυγεία, ενώ η έκφραση της αλιξίνης είναι αυξημένη στην υποξυγεία.

Όξεία υποξυγεία στον εγκέφαλο προκαλεί την έκφραση της αλιξίνης και την ενεργοποίηση του μονοκλωνικού αντισώματος anti-Alox-CT. Η έκφραση της αλιξίνης είναι ανεπάρκτη στην υποξυγεία, ενώ η έκφραση της αλιξίνης είναι αυξημένη στην υποξυγεία.

Όξεία υποξυγεία στον εγκέφαλο προκαλεί την έκφραση της αλιξίνης και την ενεργοποίηση του μονοκλωνικού αντισώματος anti-Alox-CT. Η έκφραση της αλιξίνης είναι ανεπάρκτη στην υποξυγεία, ενώ η έκφραση της αλιξίνης είναι αυξημένη στην υποξυγεία.





## C. Alix/ALG-2 une nouvelle plateforme impliquée dans le recrutement de la pro-caspase 8 dans la voie de mort du TNFR1

(Al Mahul-Mellier, F Strappazzon, K Freeman, F Hemming, S Fraboulet, R Sadoul, *en préparation*, 2007)

Nous avons pu démontrer précédemment un lien, *in vivo*, entre les protéines ESCRTs et la mort cellulaire des motoneurones cervicaux chez l'embryon de poulet. Alix pourrait faire le lien entre la voie endolysosomale et une voie de signalisation et/ou la machinerie de mort cellulaire au cours de la mort précoce des motoneurones cervicaux. Oppenheim et al, ont montré que ce processus neurodégénératif n'est pas dépendant des facteurs neurotrophiques excluant de ce fait les récepteurs aux neurotrophines (Yaginuma et al., 1996). Alix pourrait réguler le trafic d'un récepteur d'une autre famille que celle des récepteurs aux facteurs de croissance tels que les récepteurs de mort de la superfamille du TNFR1 (Tumor Necrosis Factor Receptor). Parmi les récepteurs de mort connus (TNFR1, Fas récepteur ou p75<sup>NTR</sup>), le TNFR1 a été le premier candidat que nous avons choisi. Tout d'abord, le TNFR1 est impliqué dans la mort précoce des motoneurones chez l'embryon de rat (Sedel et al., 2004) et il a été aussi récemment démontré que CIN85, un des partenaires d'Alix, est impliqué dans l'endocytose du TNFR1 (Narita et al., 2005). J'ai démontré par la technique d'électroporation *in ovo* que la délétion du site de liaison à CIN85 abolit totalement la capacité d'Alix-CT à bloquer la mort naturelle des motoneurones cervicaux *in vivo* chez l'embryon.

En parallèle de nos travaux sur le modèle de mort des motoneurones, Flavie Strappazzon, étudiante en thèse au laboratoire, a utilisé une autre approche pour comprendre le rôle d'Alix dans la mort. En comparant des immunoprécipitats contenant Alix et ALG-2 dans des neurones granulaires de cervelet sains ou induits à mourir, elle a pu montrer par analyse en spectrométrie de masse en collaboration avec J. Garin (CEA Grenoble) que ce complexe contient, en condition de mort, la caspase 8, une caspase apicale activée dans les voies de signalisation de récepteurs de morts. Ces résultats sont confirmés et l'interaction du complexe Alix/ALG-2 avec la caspase 8 est étroitement dépendante du calcium et de la capacité d'Alix à interagir avec ALG-2 (Strappazzon et al., résultats non publiés). Ces données ont permis de formuler l'hypothèse qu'Alix pourrait être utilisée comme un adaptateur permettant l'activation des caspases apicales et que ce complexe est contrôlé par ALG-2. En parallèle de ces résultats, Schütze et al ont récemment montré que l'activation de la caspase 8 par la voie de signalisation de mort du récepteur TNFR1, dans les lymphocytes, semble être déclenchée

une fois que le récepteur a été endocyté, introduisant la notion d'endosomes de mort (Schneider-Brachert et al., 2004). Basé sur ces différents faits, nous avons décidé de tester l'hypothèse d'un lien possible entre le TNFR1 et Alix/ALG-2/caspase 8 et nos résultats actuels concourent à formuler l'hypothèse qu'Alix pourrait faire un lien entre la caspase 8 et les endosomes de mort contenant le TNFR1.

## 📍 Résultats

### **1. La voie de mort du TNFR1 semble impliquée dans la mort précoce des motoneurones cervicaux dans l'embryon de poulet**

Nous avons d'abord étudié l'expression endogène du récepteur TNFR1, qui n'a pas été décrite auparavant, dans l'embryon de poulet au cours du développement pour évaluer la possibilité de sa participation au mécanisme de mort. Nous avons utilisé un anticorps polyclonal commercial (Santa-Cruz) dirigé contre la partie extracellulaire de la forme humaine du TNFR1, nous avons démontré au préalable que cet anticorps reconnaît bien la forme aviaire de la molécule (36% d'identité pour 458 acides aminés ; 40,5% d'identité dans les 222 acides aminés extracellulaires). Nous avons montré que l'expression endogène du TNFR1 débute dans le dermomyotome à partir du stade 16 HH. Le TNFR1 s'exprime dans les mêmes régions qu'Alix : dans la partie ventrale du tube neural et dans les axones des motoneurones, projetant vers la périphérie. En revanche, l'expression du TNFR1 débute après celle d'Alix et ne dure que pendant une période courte du stade 21 HH au stade 24 HH. En parallèle, nous avons montré par RT-PCR avec des oligonucléotides sens et anti-sens spécifiques du TNFR1 aviaire la présence des messagers du récepteur dans des extraits d'ARN totaux d'embryon du stade 21 au stade 27.

Pour évaluer le rôle potentiel de la voie du TNFR1 *in vivo*, le laboratoire de S. Schütze (Regensburg, Allemagne) nous a donné différentes constructions codant pour la forme sauvage du TNFR1 ou sa forme délétée de son domaine de mort DD (TNFR1 $\Delta$ DD). Ce mutant est incapable de recruter le complexe I et à terme d'activer la pro-caspase 8. Le laboratoire de P. Mehlen (Lyon) nous a également fourni un plasmide codant pour p35, une protéine de baculovirus qui est un inhibiteur général des caspases. P. Mehlen nous a également donné une forme catalytiquement inactive de la caspase 8 qui se comporte comme



un dominant négatif en prenant la place de la caspase 8 au sein du DISC. J'ai sous-cloné ces différentes constructions dans le plasmide pCAGGS permettant une excellente transfection par électroporation, *in ovo*, dans les cellules aviaires.

La surexpression de la forme sauvage du TNFR1 dans le tube neural des embryons de poulet est suffisante pour induire une mort massive, dès 24 heures après la transfection, dans l'ensemble du neuroépithélium tandis que le mutant TNFR1 $\Delta$ DD n'a aucun effet pro-apoptotique. Au contraire, TNFR1 $\Delta$ DD diminue de moitié, à 4,5 jours, le nombre de motoneurones cervicaux TUNEL positifs comme nous l'avons observé avec la moitié C-terminale d'Alix. L'expression de p35 ou du dominant négatif de la caspase 8 diminuent également le nombre de cellules marquées au TUNEL. Ainsi, la voie de mort du TNFR1 semble participer à la mort des motoneurones cervicaux chez l'embryon de poulet.

En revanche, le comptage à 5,5 jours des motoneurones survivants montre que le TNFR1 $\Delta$ DD, p35 ou le dominant négatif de la caspase 8, n'inhibent pas la mort contrairement à l'effet observé avec Alix-CT. Ces résultats confirment les observations de Yaginuma : une voie caspase-indépendante est également mise en jeu pendant la mort précoce des motoneurones cervicaux chez l'embryon de poulet (Yaginuma et al., 2001b). Nous montrons une nouvelle fois qu'Alix-CT peut bloquer les deux voies de mort à la fois caspase-dépendante et caspase-indépendante.

#### **4. Alix participe à la voie de mort du TNFR1...**

Pour disséquer le rôle potentiel d'Alix dans la voie de signalisation du TNFR1, nous avons développé, en parallèle, un modèle de mort *in vitro* dans la lignée cellulaire des HEK293. Dans ces cellules, la simple surexpression du TNFR1 est suffisante pour induire la mort cellulaire (Todd et al., 2004). L'ajout du ligand, le TNF $\alpha$ , n'est pas nécessaire puisque la surexpression du récepteur TNFR1 est suffisante pour provoquer son auto-activation. Le taux de mortalité cellulaire est calculé sur la base de la morphologie nucléaire marqué en présence du Hoechst: tout noyau condensé ou fragmenté est considéré comme appartenant à une cellule morte. Le mutant TNFR1 $\Delta$ DD est incapable d'induire la mort. Pour confirmer l'importance de l'internalisation du récepteur dans le déclenchement de la voie de mort, j'ai utilisé deux dominants négatifs de la voie endolysosomale dans ce modèle de mort : une forme mutée de la dynamine bloquant toute internalisation de récepteurs de surface passant pas la clathrine et un dominant négatif de l'enzyme ATP-ase SKD1 qui permet la dissociation de ESCRT-III des corps multivésiculés (MVB). Seul le dominant négatif de la dynamine est capable de bloquer

la mort induite par la surexpression du TNFR1 alors que l'inhibition du trafic à travers les MVB due au mutant SKD1 n'a pas d'effet sur la mort.

J'ai également testé les mutants d'Alix neuroprotecteurs, dans l'embryon de poulet, dans ce modèle de mort *in vitro*. Alix $\Delta$ ALG-2 et Alix-CT sont effectivement capables de bloquer la mort induite par le TNFR1. En revanche, Alix $\Delta$ CIN85, Alix $\Delta$ endophilin et Alix $\Delta$ TSG101, différents mutants délétés de leur site d'interaction nécessaire à leur liaison avec les partenaires impliqués dans la voie endolysosomal, n'ont aucun effet protecteur.

## **5. ...sans contrôler l'internalisation du TNFR1**

Les observations de Schmidt et al ont impliqué Alix dans le contrôle de l'internalisation du récepteur à l'EGF (Schmidt et al., 2004). Nous avons voulu savoir si le rôle protecteur observé avec Alix $\Delta$ ALG-2, dans notre modèle de mort, pouvait être dû à un possible effet sur l'internalisation du TNFR1. Nous avons utilisé le TNF $\alpha$  marqué à l' [I<sup>125</sup>] pour suivre l'internalisation du récepteur en présence du dominant négatif de la dynamine, d'Alix ou d'Alix $\Delta$ ALG-2 dans les BHK-21. Ces cellules ne meurent pas par surexpression du TNFR1, ce qui nous a permis de nous affranchir de la perte cellulaire qui empêcherait la normalisation du nombre de cellules par puits. Seule la co-transfection du TNFR1 avec le dominant négatif de la dynamine bloque significativement son internalisation. Alix et Alix $\Delta$ ALG-2 n'ont aucun effet sur l'endocytose du TNFR1.

## **6. Alix interagit dans un complexe contenant le TNFR1**

Nous avons également développé en parallèle du modèle de mort, des expériences de co-immunoprécipitation dans les HEK293 pour connaître les relations moléculaires éventuelles entre le TNFR1 et Alix.

Alix immunoprécipite avec le TNFR1 entier surexprimé mais pas avec le TNFR1 délété de son domaine de mort DD. Alix $\Delta$ CIN85, Alix $\Delta$ endophilin et Alix $\Delta$ TSG101, des mutants d'Alix qui ne sont plus capables de lier les partenaires impliqués dans l'endocytose et la voie endolysosomale n'immunoprécipitent plus avec le TNFR1. Seul le mutant Alix $\Delta$ ALG-2 est encore capable d'interagir avec le récepteur.

Alix immunoprécipite également avec différents partenaires du TNFR1 endogènes : CIN85 et RIP. J'ai également observé qu'ALG-2 et la pro-caspase 8 sont capables d'immunoprécipiter avec le TNFR1.

## **7. Alix est présent sur des endosomes contenant TNFR1**

J'ai développé, dans les HEK, un système de purification spécifique des endosomes contenant le TNFR1 et son complexe de protéines adaptatrices associé. J'ai ainsi pu démontrer qu'Alix et ALG-2 sont localisés au niveau des endosomes contenant TNFR1, RIP1, FADD et la caspase 8.

### **📍 Discussion, perspectives et conclusions**

Mes précédents résultats mettent en évidence l'implication du complexe Alix/ALG-2 avec les protéines ESCRTs dans la mort naturelle et physiologique des motoneurones chez l'embryon de poulet. Au cours de ma dernière année de thèse, j'ai donc développé différents modèles, *in vivo* et *in vitro*, pour comprendre si Alix est un nouvel effecteur de la machinerie de destruction de la cellule et/ou un maillon dans la voie de signalisation d'un récepteur.

J'ai démontré que pour être protecteurs, les mutants d'Alix requièrent un domaine d'interaction avec CIN85, suggérant l'implication d'un récepteur lors de la mort précoce des motoneurones cervicaux. Notre premier candidat testé a été le récepteur de mort TNFR1. J'ai observé que ce récepteur est exprimé dans les motoneurones de l'embryon de poulet durant la mort cellulaire programmée précoce et que l'expression de dominants négatifs du TNFR1 bloquent ce phénomène.

Pour disséquer l'implication d'Alix dans la voie de signalisation du TNFR1, j'ai dû réaliser une partie de mes recherches *in vitro*. Mon premier choix s'est porté sur les cellules BHK-21 car elles permettent facilement la séparation des endosomes précoces des endosomes tardifs. Ces cellules nous auraient permis d'étudier plus précisément si le complexe Alix/ALG-2 est recruté sur un de ces compartiments après stimulation au TNF $\alpha$ . Malheureusement, il m'a été impossible de déclencher la voie de mort du TNFR1 dans cette lignée. J'ai donc utilisé par la suite les cellules HEK 293 où la simple surexpression du TNFR1 induit ces cellules à mourir (Todd et al., 2004). J'ai pu montrer dans cette lignée que les mutants Alix $\Delta$ ALG-2 et Alix-CT peuvent bloquer efficacement la mort cellulaire dépendante du TNFR1. J'ai également démontré par co-immunoprécipitation, qu'Alix interagit physiquement avec le TNFR1 par son domaine de mort.

Pour comprendre plus précisément cette interaction, j'ai utilisé différents mutants d'Alix. Seul le mutant Alix $\Delta$ ALG-2 est encore capable de lier le TNFR1. Le rôle protecteur de ce mutant pourrait s'expliquer par un effet similaire à celui d'un dominant négatif de la voie de mort du TNFR1. En effet, l'interaction de la caspase 8 avec le complexe Alix/ALG-2 nécessite l'intégrité de ces deux dernières protéines (Strappazzon et al., non publié). Alix $\Delta$ ALG-2 est toujours capable de se lier au complexe TNFR1 mais ne peut plus interagir avec ALG-2 et pourrait ainsi empêcher le recrutement de la caspase 8 sur le complexe protéique du TNFR1 et ainsi empêcher son activation. Alix interagit également avec des partenaires du récepteur tel que CIN85, RIP1 et la caspase 8. La technique de purification des endosomes de mort contenant le TNFR1 m'a permis de démontrer la présence de FADD, du complexe Alix/ALG-2 et de la caspase 8 au niveau de ces structures.

**Nos résultats suggèrent qu'Alix opère en aval du récepteur de mort TNFR1, aussi bien au cours de la mort programmée des MTN *in ovo* que dans des cellules induites à mourir *in vitro* par surexpression du TNFR1.**

Les résultats de Schmidt et al., montrent un rôle d'Alix dans l'internalisation du récepteur à l'EGF. Alix pourrait être impliquée dans la voie de mort du TNFR1 en contrôlant son endocytose ou son trafic dans les compartiments endosomaux. Dans un premier temps, j'ai utilisé des dominants négatifs spécifiques de la voie endolysosomale pour analyser le rôle de cette voie, *in vivo* dans la mort des motoneurones mais également *in vitro* dans notre modèle de mort dépendant du TNFR1. Chez l'embryon de poulet, le blocage général de l'endocytose des récepteurs par le dominant négatif de la dynamine 2a et le blocage de la formation des MVBs par le dominant négatif de l'ATPase SKD1 entraînent la mort de la quasi-totalité des cellules du neuroépithélium rendant impossible l'analyse de ces mutants sur la mort naturelle des motoneurones. J'ai utilisé ces mêmes mutants *in vitro*. Cette fois-ci j'ai pu observer que le dominant négatif de la dynamine 2a protège les cellules de la mort induite par la surexpression du TNFR1. En revanche, le mutant de SKD1 n'a aucun effet protecteur. Seules les premières étapes de la voie endolysosomale semblent requises dans le déclenchement de la mort cellulaire dépendante du TNFR1. J'ai également démontré qu'Alix n'a aucun effet sur l'internalisation du TNFR1.

**Alix ne régule pas la voie de mort du TNFR1 en participant à son endocytose. Le complexe Alix/ALG-2 pourrait réguler la voie du TNFR1 en permettant la formation d'une plateforme d'adaptation de la caspase-8 menant à son activation au niveau des « endosome de mort » contenant le TNFR1.**

La liaison moléculaire entre Alix/ALG-2 et la caspase 8 dépend du  $\text{Ca}^{2+}$ . Si le recrutement de la caspase 8, sur le complexe TNFR1 au niveau des endosomes de mort, dépend du complexe Alix/ALG-2, il doit être extrêmement sensible aux variations calciques. Pour valider notre hypothèse de travail, nous allons isoler les endosomes de mort en présence ou en absence de calcium et voir si le recrutement de la caspase 8 est modifié dans ces conditions. De plus, il a été montré, récemment, que le récepteur Fas est également localisé dans des endosomes de mort et que c'est au niveau de ces structures que FADD et la caspase 8 sont principalement recrutées (Lee et al., 2006). Il va être extrêmement intéressant de comprendre si le mécanisme de régulation d'une voie de signalisation par la plateforme protéique Alix/ALG-2/ESCRTs localisée au niveau des endosomes est propre au TNFR1 ou à l'ensemble de la famille des récepteurs de mort. Il serait également très intéressant de regarder si le complexe Alix/ALG-2/ESCRTs est impliqué dans la régulation d'autres voies de mort. Les récepteurs à dépendance, qui induisent l'apoptose en absence de leur ligand, seraient d'excellents candidats puisque les mécanismes permettant le recrutement et l'activation des caspases dans leurs voies de signalisation restent à ce jour inconnu (Bredesen et al., 2005).

Cependant, nous sommes conscients que cette hypothèse est basée sur un travail réalisé en surexprimant le TNFR1 et Alix ce qui pourrait peut-être induire une accentuation d'interactions protéiques. Pour confirmer ces travaux, nous souhaitons développer un modèle qui puisse s'affranchir de la surexpression du TNFR1. La lignée cellulaire HeLa semble répondre à cette exigence puisque le seul ajout du  $\text{TNF}\alpha$  permet de déclencher la mort de ces cellules. Nous pensons que ces lignées sont suffisamment riches en TNFR1 pour tester l'existence d'interactions endogènes entre Alix, le TNFR1 et les différents partenaires. D'autre part, les cellules HeLa se révèlent être une lignée de choix pour éteindre efficacement l'expression endogène d'Alix d'après des expériences préliminaires. Nous pourrions ainsi tester la capacité des cellules HeLa à mourir en l'absence d'Alix et comprendre le degré d'importance d'Alix dans le mécanisme de recrutement de la caspase 8 sur les endosomes de mort. Pour réellement comprendre ce mécanisme, nous devons également, en parallèle, réaliser ces expériences dans des cellules HeLa n'exprimant plus ALG-2.

Les données récentes de Fisher et al. ont permis de révéler que le domaine BRO1, situé à l'extrémité N-terminale d'Alix, est rattaché par un pont hydrophobique à un domaine formant une structure en « V » composée de deux bras, chacun possédant trois hélices empaquetées (Fisher et al, 2007). Le domaine PRD d'Alix nécessaire pour les interactions de la protéine avec la majorité de ses partenaires se comporterait comme une extrémité flottante régulant l'ouverture ou la fermeture du domaine centrale en « V ». C'est par ce domaine en « V » que les partenaires d'Alix ayant une séquence YPX<sub>n</sub>L, telles que les protéines GAG des virus, interagissent avec Alix. La séquence YPX<sub>n</sub>L est une séquence consensus retrouvée de façon très large dans de nombreuses protéines. Néanmoins, nos recherches prédictives (Prosite) ont montré que FADD et TNFR1 possédait ce domaine YPX<sub>n</sub>L. En fonction de sa conformation ouverte/fermée, Alix pourrait permettre l'adaptation de la caspase 8 par FADD sur le complexe du TNFR1.

Cependant, malgré ces résultats probants sur l'existence d'un lien entra Alix/ALG-2 et la plateforme d'activation de la caspase 8 par les endosomes de mort contenant le TNFR1, nous ne parvenons pas à expliquer toutes nos observations. En effet, Trioulier et al ont observé que l'inhibition de l'activation des caspases dans les neurones granulaires de cervelet déprivés en potassium bloque la destruction du noyau mais ne permet pas d'empêcher la destruction du cytoplasme contrairement à ce qui est observé avec Alix-CT (Trioulier et al., 2004). Nous avons obtenu des résultats similaires dans les motoneurones cervicaux chez l'embryon de poulet. J'ai montré dans l'embryon de poulet, que la surexpression d'un dominant négatif de la caspase 8 ou de p35, l'inhibiteur général des caspases, retarde la mort précoce des motoneurones cervicaux sans toutefois l'inhiber contrairement à ce qu'on observe avec certains des mutants d'Alix. Oppenheim et ses collaborateurs ont également démontré que l'utilisation de peptides inhibiteurs des caspases ne permet pas de sauver les motoneurones de la mort cellulaire programmée mais juste de la retarder (Yaginuma et al., 2001b). Les auteurs suggèrent qu'un mécanisme caspase-indépendant est mis en place durant la mort naturelle des MTN cervicaux (Yaginuma et al., 2001a). J'obtiens donc les mêmes résultats que ceux publiés par Oppenheim et al., suggérant que la capacité des mutants d'Alix à bloquer cette mort passe par un contrôle non seulement de la voie caspase-dépendante mais également de la voie caspase-indépendante. Une explication plausible pourrait être qu'Alix/ALG-2 contrôlerait le trafic d'autres récepteurs impliqués dans la survie neuronale. Nous n'avons pas retenu cette hypothèse car il a été démontré que la mort des motoneurones cervicaux est indépendante des facteurs neurotrophiques (Yaginuma et al., 1996). Les mécanismes

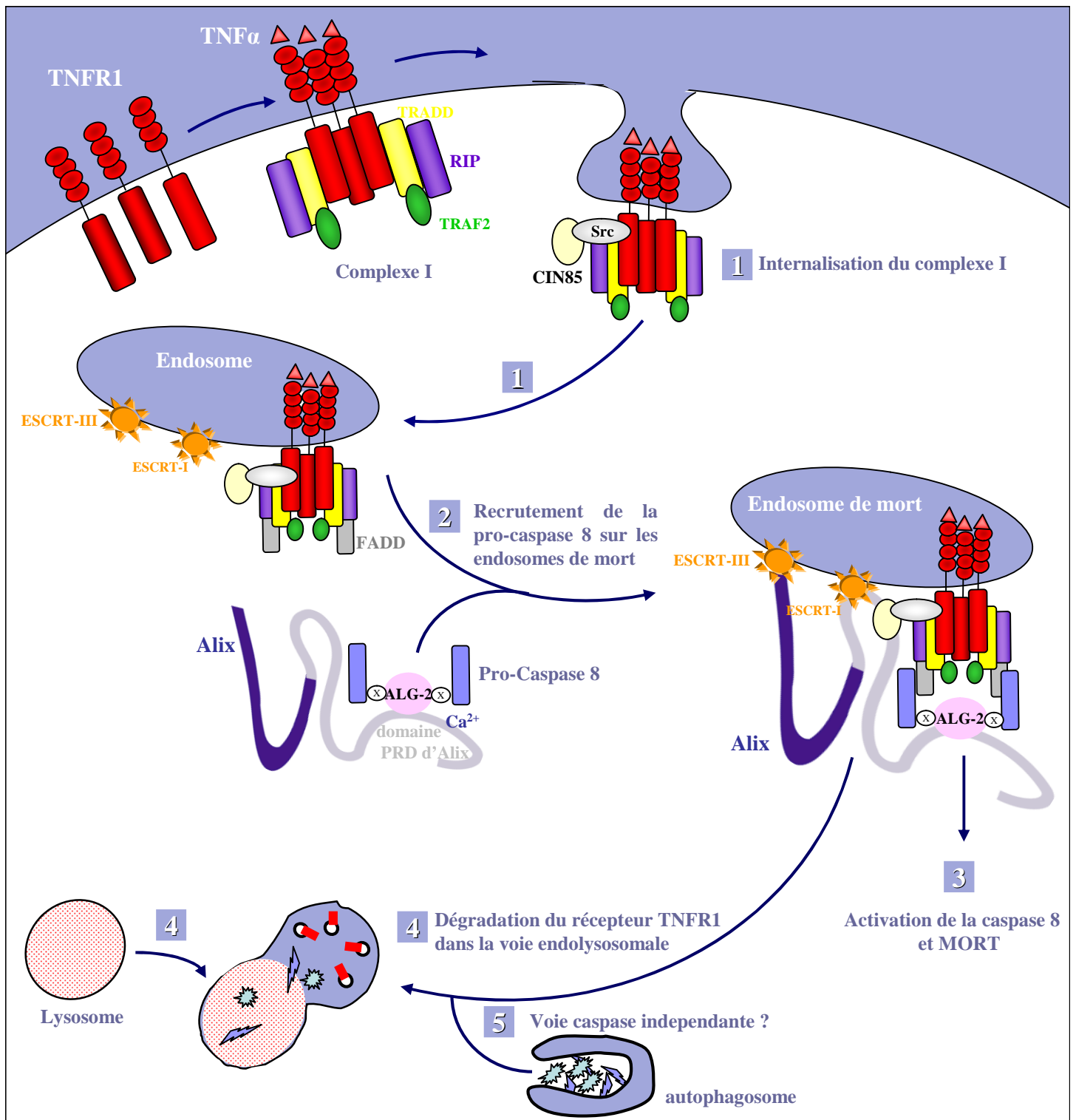
moléculaires caspases-indépendants dans cette mort cellulaire restent encore inconnus. La formation de vésicules de type autophagique a été mise en évidence par microscopie électronique lors du blocage de la mort cervicale des motoneurones par des peptides inhibiteurs des caspases. De plus, une nouvelle signalisation moléculaire a été identifiée dans laquelle l'autophagie peut être induite, via les récepteurs de mort, par l'activation de la protéine RIP et des JNK (Baehreck, 2005). La voie du TNFR1 pourrait mettre en jeu à la fois des mécanismes caspases-dépendants et caspases-indépendant. Pour savoir si le processus d'autophagie est mis en place lorsque j'inhibe l'activation des caspases par le p35 ou le dominant négatif de la caspase 8 ou lors de la surexpression de mutants d'Alix capables de bloquer la mort des motoneurones, j'ai utilisé la transfection du cDNA de la protéine cytosolique LC3 connue comme marqueur des processus autophagiques. J'ai rencontré plusieurs difficultés techniques qui m'ont empêché de conclure sur la présence du mécanisme autophagique au cours de la mort des motoneurones cervicaux. L'expression du LC3 est forte et diffuse dans les cellules sans processus autophagiques. En revanche, au cours des déclenchements des processus d'autophagie, le LC3 a la capacité de se relocaliser sur des vésicules autophagiques donnant un marquage ponctué et extrêmement difficile à observer. La diminution de l'épaisseur des coupes de tissu nerveux à 4  $\mu\text{m}$  n'a pas été suffisante pour supprimer le bruit de fond provenant des cellules surexprimant le LC3 de manière diffus, nous empêchant d'observer le marquage vésiculaire du LC3. Anne Petiot, une spécialiste de l'autophagie, travaille aujourd'hui dans le laboratoire et va développer d'autres systèmes et proposer d'autres marqueurs pour comprendre si l'autophagie est impliquée dans la mort des motoneurones cervicaux.

Mon travail de thèse, sur le complexe Alix/ALG-2 a mis en évidence un lien, *in vivo*, entre la voie endolysosomale et la machinerie de mort cellulaire active au cours du processus de mort naturelle des motoneurones chez l'embryon de poulet. Mes récents résultats suggèrent qu'Alix opère en aval du récepteur de mort TNFR1, aussi bien au cours de la mort programmée des motoneurones *in ovo* que dans des cellules *in vitro* mourant par surexpression de TNFR1. Le complexe Alix/ALG-2 semble former une plateforme de recrutement et d'adaptation de la caspase 8 sur le complexe du TNFR1 localisé au niveau des endosomes. L'activation de cette caspase, initiatrice dans la mort déclenchée par la voie de signalisation du récepteur TNFR1, serait ainsi contrôlée par les « endosome de mort » contenant le TNFR1.

J'ai essayé au cours de ces 4 années de thèses d'apporter, par des approches de biologie cellulaire et moléculaire, de nouvelles données sur le processus de régulation, de la mort cellulaire impliqué, dans la dégénérescence des motoneurones pouvant être à l'origine de pathologies neurodégénératives.

Depuis 15 ans, le développement rapide de la recherche, dans le domaine d'étude de la mort cellulaire programmée, nous a livré une bonne compréhension de la façon dont la mort cellulaire s'accomplit. Néanmoins, afin d'exploiter ces connaissances dans des buts thérapeutiques, il nous faut encore beaucoup apprendre sur la manière dont une cellule s'engage sur la voie de la mort.





**Figure 33 : Hypothèse de travail, Alix/ALG-2 une nouvelle plateforme impliquée dans le recrutement de la pro-caspase 8 dans la voie de mort du TNFR1.**

1 : L'internalisation du TNFR1, par CIN85 et Src, est déclenchée par la fixation du TNF $\alpha$  et permet à l'ensemble du complexe I de se retrouver au niveau des endosomes où FADD pourrait être recrutée. Nous montrons qu'Alix est également présente sur ces structures où elle interagit avec le complexe TNFR1.

2 : La pro-caspase 8 a la capacité de lier le complexe Alix/ALG-2. Le domaine PRD d'Alix, qui est un domaine flexible, pourrait permettre l'adaptation de la pro-caspase 8, via son interaction avec ALG-2, sur la protéine FADD du complexe TNFR1 située au niveau des endosomes.

3 : Activation de la caspase 8 et déclenchement de la mort.

4 : Dégradation du récepteur TNFR1 dans la voie endolysosomale.

5 : L'inhibition des caspases, in vivo, dans les motoneurones ne bloque pas leur mort. L'autophagocytose, un processus de destruction de la cellule par la voie endolysosomale pourrait être également impliquée.









3 Óù: È » °@ª.±«-‘š ±¼-»@ª¼ ρ, ζ γ » °@---±2 ±0 Β.™ÖÝÌ ¾½±½μ- ½ζ-ºζ-» ζ½-ªζγ-±2 .2 2»«@±2- ¼°@ª¼ ±0 °±ζ-... 3 ΑΓÉÁΘ È » «-»¼ ζ °±š¼±2ζ ζ²γ-óΒ.™ ζ²γ-¾±¼š ± .3 3«2±°@¾º-γζγ» ρ, ζ » 2¼±1»2±«- °@±γ»-2 °@±3 ½» ‘‘S-ζγ»- 3¼¼» °@±3 2»«@±2- .2¼¼ζγ-¼ °@±0 í, ±«@- .2 ē 3 Ó °±ζ-... 3 ð È--21 °º-γ¼» 3 ζ-- 0.21»@°@.2γ.21 θ-»» Óζγ»@-ζ- ζ²¼ Ó»γ, ±¼-÷ Ò » °±«2¼ ½ζ-ºζ-»òè ζ³±21 ρ, ζ » °@±γ»-2- ½±ó.3 3«2±°@¾º-γζγ»¼ ©-γ, Β.™ò «-«11»-γ.21 ρ, ζ γ ρ, ζ » °@±γ»ζ-» 3 ζš °, š-½ζ‘š ζ-½½ζ-γζγ ©-γ, Β.™ò È » °@±γ»@-±©¼ ρ, ζ γ .2 ÞΘÓÎÏ ½» ‘‘-ò Ù‘ζ¹óγ¹¹¾óΒ.™ Ñ‘ζ¹óΒ.™÷ ζ²¼ ζ² ΘΒóζ¹¹¾óó ½ζ-ζ‘S-γ½ζ‘S .2 ζ½-ª»ª@-±2ò ±0 °@±ó½ζ-ºζ-»òè θθΒóÜÓó°±ó ½ζ-ºζ-»òè: Ñ.1«@ Ï ÷ ½±ó.3 3«2±°@¾º-γζγ»¼ò Ì, -- ¼» 3±2-@ζγ-»- ρ, ζ γ ρ, ζ » ©± °@±γ»-2- »--- .2 ζ ½±3 ó’» ζ²¼ ρ, ζ γ ζ½-ª-š ±0 ρ, ζ » ½ζ-ºζ-» -2±γ @-«@¼ °±0 ρ, ζ --.2γ»@ζ½γ-±2 Ñ.1«@ ÍΒ÷ Ù«@» 3 ±0ò ¼»»γ-±2 ±0 ρ, ζ » °@±¼±3 ζ.2 ±0 °@±ó½ζ-ºζ-»òè ½±2γζ.2.21 ρ, ζ » ©± ÙÙÛ ¼±3 ζ.2- ζ¼±-»¼ ρ, ζ » ½ζºζ½-š ±0 ρ, ζ » ½ζ-ºζ-» ±2γ»@ζ½γ ©-γ, Β.™ Ñ.1«@ ÍΒ÷ Ñ¾¼γ-±2 ±0 Ï 3 Ó Ý ζ¹ó.2 ρ, ζ » ‘S-ζγ»- -@.μ.21‘S »2, ζ²¼¼ ρ, ζ » ζ³±«2γ ±0 Β.™ ½±ó.3 3«2±°@¾º-γζγ»-21 ©-γ, °@±ó½ζ-ºζ-»òè Ñ.1«@ ÍΒ÷ ζ²¼ ©» ¼γ»¼γ¼» 2¼±1»2±«- ΒÓÙóÏ .2 .3 3«2±°@¾º-γζγ»- ½±2γζ.2.21 ±ª»@°--¼ Β.™ ζ²¼ °@±ó½ζ-ºζ-»òè Ñ.1«@ ÏÝ÷ Ì, -- °@±3 óγ¼ «- ±γ»-γ ζ °±γ2γζ.2γ»@ζ½γ-±2 ±0 °@±ó½ζ-ºζ-»òè ©-γ, ΒÓÙóÏ ©, ±» ¾.2¼.21 ± Β.™ ¼º»²¼- ±2 ½ζ½ζ«3 ð x2 ρ, ζ » ½ζ-» ©, »@ ΒÓÙóÏ ©ζ- ½± »°@--¼ ©-γ, ÙÓó°±ó ½ζ-ºζ-»òè ΒÓÙóÏ ½±ó.3 3«2±°@¾º-γζγ»¼ ©-γ, ρ, ζ » ½ζ-ºζ-» .2 °@»-»2¼ ±0 Ï 3 Ó Ý ζÝ Ï Ñ.1«@ ÍΒ÷ Ø»@ ζ¹ζ.2ò ρ, ζ --.2γ»@ζ½γ-±2 @-«@¼ ρ, ζ » °@±ó½±3 ζ.2 ±0 ρ, ζ » ½ζ-ºζ-» Ñ.1«@ ÍΒ÷ Ù‘ζ¹óΒ.™ ¼»»γ¼ ±0 ρ, ζ » -»«2¼» ÐΘÍÐΧΘÍΧΘÏΧΘÏΧΘÏ 2¼¼--ζš °±0 ρ, ζ » ¾.2¼.21 ±0 ΒÓÙóÏ ΑΓÉÁ ΘΒ.™ ΔΒÓÙóÏ÷ Ñ.1«@ Ï ÷ ¼¼ 2±γ. 3 3«2±°@¾º-γζγ» ©-γ, ÙÓó°±ó ½ζ-ºζ-»òè Ñ.1«@ ÏÝ÷ Ñ² ρ, ζ » ±γ, »@ ζ²¼ò ΒÓÙóÏ ½±«¼¼ ½±ó.3 3«2±°@¾º-γζγ»¼ ©-γ, ÙÓó°±ó½ζ-ºζ-»òè «ζ‘š ©»’°@±3 ‘S-ζγ»- ±0 ©γ ÞΘ Ò ½» ‘‘- ±0 °@±3 ½» ‘‘- .2 ©, ½, Β.™ »°@---±2 ζ¼ ¾»2 ¼±©2 @¹‘ζγ»¼ «-.21 ζ °Í«@ª ¾±±@ ½±¼.21 °±0 ζ² - ÌÒΒ ζ¹ζ.2-γ Β.™ò .2¼¼½ζγ-21 ρ, ζ γ ΒÓÙóÏ ½ζ² .2γ»@ζ½γ ©-γ, °@±ó½ζ-ºζ-»òè .2¼¼»º¼2γš ±0 Β.™ Ñ.1«@ ÍÛ÷ Β.™ .3 3«2±°@¾º-γζγ»- ©-γ, ÌÓÙóÏ .2¼¼º»²¼2γš ±0 ΒÓÙóÏ Ì, » ¼» 3±2-@ζγ-±2 ρ, ζ γ ÌÓÙóÏ 2¼¼»- »2¼±¼šγ-±-÷ ±γ @¼«-γ °@±ó½ζ-ºζ-»òè °@±3 óγ¼ «- ±γ»-γ ©, ρ, ζ » °@ Β.™ ζ²¼ ΒÓÙóÏ ½ζγ ζ-

¼ζºζ-±0- ¾.21.21 °@±ó½ζ-ºζ-»òè .2γ± ½±-»ª.½.2-š ±0 »2¼±±3»- ½±2γζ.2.21 ÌÓÙóÏ Ò Ù.@-ò ©» ‘‘ζ³.2¼ ©, »γ »@ Β.™ ζ²¼ ΒÓÙóÏ ½ζ² °±0 3 ζ ½±3 ó’» ©-γ, ÌÓÙóÏ Ò Ì, »-» »°@-3 2γ- ©»@ »°@±0 3¼ .2 ØÜÖ ÏÇÍ ½» ‘‘- @ζ²--2γš @ζ²-º¼»¼ ©-γ, »°@---±2ª ¾±±@- ½±¼.21 °±0 ÌÓÙóÏ Ìζ¼ Β.™ò Β- @»°±γ¼ ΑΓÍÁΘ ÌÓÙóÏ Ìª»@°--±2 ©ζ- -«0.½.2γ ±ζ .2¼¼½» ζº±ºγ-÷ ðª2 .2 ζ¼¼2¼ ±0 ÌÓÙóÏ È»-»@2 ¾¼γ ζ²ζ‘S-- ±0 Β.™ ±0 ÌÓÙóÏ .3 3«2±°@¾º-γζγ»- Ñ.1«@ ÌΒ ζ²¼ 2±γ -½±©2÷ @ªζ‘¼ ρ, ζ » °@»-»2¼ ±0 ÌÓÙóÏ Ìζ¼ Β.™ @»º»ª»‘Sð «11»-γ.21 ρ, ζ » «-»2¼ ±0 ζ ½±3 ó’» ½±2γζ.2.21 ¾±γ, °@±γ-2-ò È » °@±γ, »@ °±ª¼ ρ, ζ » «-»2¼ ±0 -¼, ζ ½±3 ó’» ¾š -±©.21 ρ, ζ γ »2¼±1»2±«-š »°@--¼ Β.™ -- «‘’¼ ¼±©2 ©-γ, »2¼±1»2±«- ÌÓÙóÏ .3 3«2±°@¾º-γζγ»¼ °@±3 Ø‘ζ ½» ‘‘- Ñ.1«@ ÌΒ÷ x² ØÜÖ ÏÇÍ ½» ‘‘-ò ÌÓÙóÏ 3 «ζ2γ ¼»»γ¼ ±0 ρ, ζ » ¼±3 ζ.2 ð ÌÓÙóÏ ÌÙÙ÷ Ñ.1«@ Ï ÷ ¼¼ 2±γ ½±ó.3 3«2±°@¾º-γζγ» ©-γ, Β.™ò .2¼¼½ζγ-21 ρ, ζ γ ρ, ζ » .2γ»@ζ½γ-±2 ¼º»²¼- ±2 ρ, ζ » .2γ¹@-š ±0 ρ, ζ -- @¹.±2 Ñ.1«@ ÌÝ÷ Β.™ ΔΒÓÙóÏ ©, ½, ¼±- 2±γ .2γ»@ζ½γ ©-γ, °@±ó½ζ-ºζ-»òè ©ζ- ½ζºζ½» ±0 ½±ó .3 3«2±°@¾º-γζγ»-21 ©-γ, ÌÓÙóÏ Ñ.1«@ ÌÝ÷ Ì, -- «2¼@-½±@»- ρ, ζ » °½γ γ, ζ γ ¾.2¼.21 ±0 Β.™ ±ζ ÌÓÙóÏ ½±3 ó’» --.2¼º»²¼ ±0 ΒÓÙóÏ Ìζ¼ ±0 °@±ó½ζ-ºζ-»òè x2γ»-γ.21‘Sð Β.™ 3 «ζ2γ- ζ¼μ.21 ρ, ζ » ÞΘ±Ï ¼±3 ζ.2ò @-«@¼ °±0 .2γ»@ζ½γ-±2 ©-γ, ÝΘÓÐÍÐ ð ±0 °±@ ζ³.2± ½ζ¼- 2¼¼--ζš °±0 ¾.2¼.21 ± Ì-Ïò Ò»@» 2±γ ½ζºζ¼» ±0 ½±ó°@¾º-γζγ-21 ©-γ, ÌÓÙóÏ Ñ.1«@ ÌÛ÷ Ì, «-ò ½±ó .3 3«2±°@¾º-γζγ»-±2 ±0 Β.™ ©-γ, ÌÓÙóÏ @-«@- -γ ζ¼-š ±ζ ¾.2¼ ÙÍÝÏ Ì °±ª»-2-ò ΒÓÙóÏ .3 3«2±°@¾º-γζγ»- ©-γ, ÌÓÙóÏ .2 ζ ©ζš ©, ½, γ.1 , ‘S ¼º»²¼- ±2 -γ ½ζºζ½-š ±ζ ¾.2¼ ½ζ½ζ«3 ð È » 2γ»- μ¼¼ ©, ρ, ζ » ΒÓÙóÏ ½ζ² ζ --½±ζγ-± ± ÌÓÙóÏ Òšγ-ζγ- °@±3 ØÜÖ ÏÇÍ ½» ‘‘- ½±ó @ζ²-º¼»¼ ©-γ, Ù‘ζ¹óΒÓÙóÏ Ìζ¼ ©-¼ó-Sº ÌÓÙóÏ »°@---±2ª ¾±±@ ©»@» .3 3«2±°@¾º-γζγ»¼ ©-γ, ζ2γ-óÛ‘ζ¹ Ñ.1«@ ēΒ÷ ±0 ©-γ, ζ2γ-ò ÌÓÙóÏ Ìζ²γ¾±¼-»- θ2±γ -½±©2÷ x² ¾±γ, ½ζ-»-ò È »-»@2 ¾¼γ-»ª»ªζ¼ ½±ó.3 3«2±°@¾º-γζγ»-±2 ±0 ÌÓÙóÏ Ì ©-γ, ΒÓÙóÏ Ù«@» 3 ±0ò »2¼±1»2±«- Β.™ ©ζ- ¼»»γ¼¼ .2 ρ, ζ » ΒÓÙóÏ .3 3«2±°@¾º-γζγ»- ½±2γζ.2.21 ÌÓÙóÏ Ñ.1«@ ēΒ÷ È » ζ-± «-¼ ζ³ «γγ¼ °±0 ±0 ΒÓÙóÏ Ì ΒÓÙóÏ ÌÙÙÏ ð ½±±@.21 °±2γ 3 «γγ-±2- .2 ρ, ζ » °@-γ ζ²¼ ρ, ζ » @¼ ÙÛ ζ²¼- ©, ½, ζ¼±-»- -γ ½ζºζ½-š ±ζ ¾.2¼ ½ζ½ζ«3 ð x² ζ¼±±@ζ²¼ ±ζ











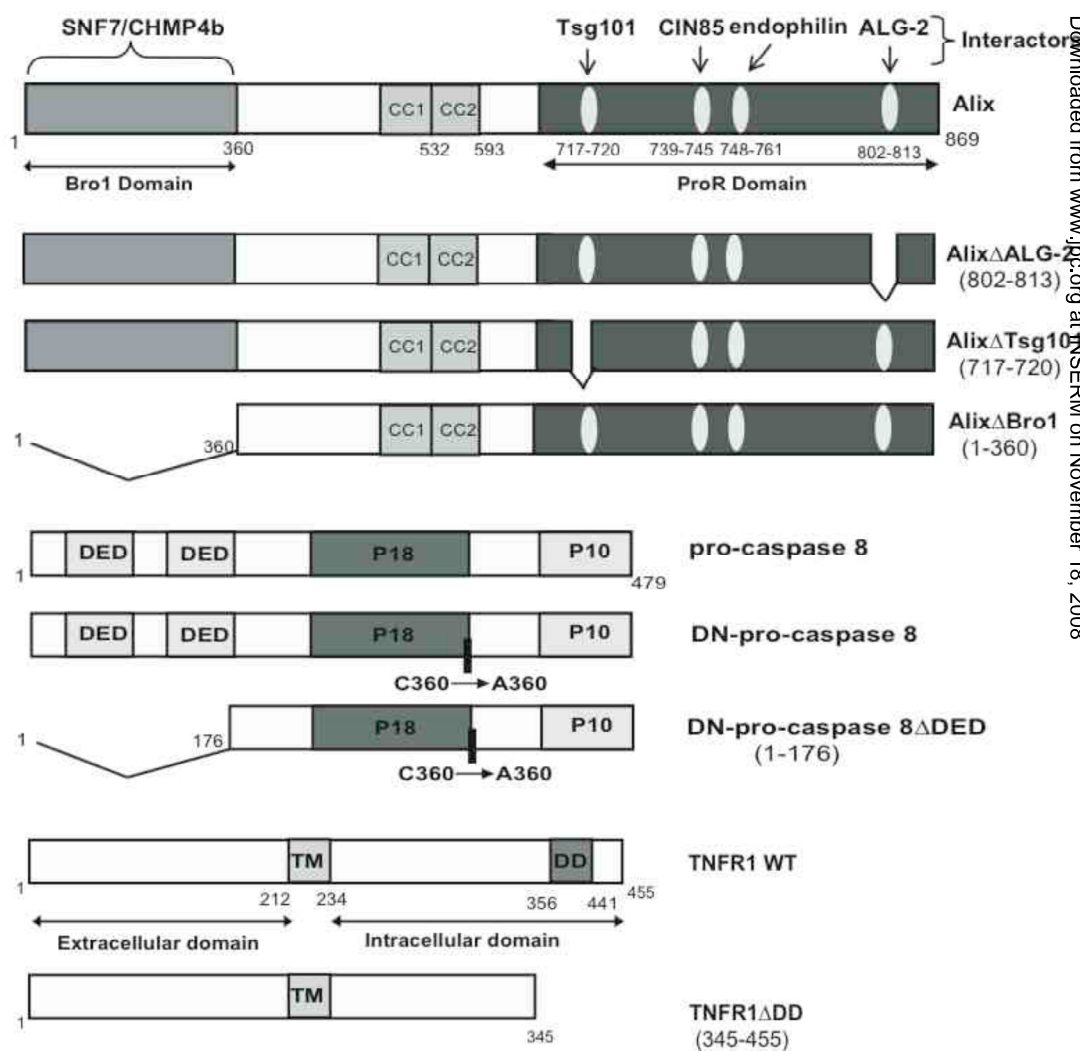
ī īō Y<sub>2</sub>z<sub>2</sub>''z<sub>2</sub>0%Yz<sub>2</sub>«--»ō Yōō P'±ō Pōō Yō--r<sub>2</sub>z<sub>2</sub>ō Ōōō Ī±0%<sub>2</sub>ō Īōō Ō---±r<sub>2</sub>»<sub>2</sub>ō Ōōō z<sub>2</sub>% Īz<sub>2</sub>±«'ō Īō  
 ōīōōī÷ō P-±' Y<sub>2</sub>»<sup>3</sup> īēēōīī÷ō īçīēōōīçīēēō  
 ī īō Y<sub>2</sub>»<sub>2</sub>ō Pōō P±0<sub>2</sub>-r<sub>2</sub>»<sub>2</sub>ō Īō Yōō Ū''-ō Ōōō Īšµ»-ō Ēō Ēōō z<sub>2</sub>% P±1'»ōō Ńō ōīōōō÷ō Ō P-±'  
 Y<sub>2</sub>»<sup>3</sup> īēēōīēōō īçīēēōōīçīēēō  
 īēō Yz<sub>2</sub>%»Īz<sub>2</sub>-ō Bōō Pz<sub>2</sub>%»ō Ōō Ūōō P0%<sub>2</sub>ō Bōō z<sub>2</sub>% Īr<sub>2</sub>»<sup>2</sup> z<sub>2</sub>0µō ōō ōīōōō÷ō Ō Y<sub>2</sub>'' Īz<sub>2</sub>- īīēōō- īī÷ō  
 īēīēōīēīē  
 īēō Īz<sub>2</sub>»<sup>3</sup>-z<sub>2</sub>ō Ōō ōōō ō±»''ōō Ūōō Ç«ō Ōōō Ū«0z<sub>2</sub>0-ō Ūō Pōō Yz<sub>2</sub>»<sup>a</sup>»<sub>2</sub>ōō Ēō Ōōō Ū-µ-½ō xōō z<sub>2</sub>%  
 P±1'»ōō Ńō ōīōōī÷ō Ō±' Y<sub>2</sub>'' P-±' īīōīō÷ō ēçēīōēççīō pYBōDēççōīōççēēīēñYBñŌYxpō  
 pYBōĪççēēōīōēīōççñYBñŌYxp p0±«0z<sub>2</sub>' B0r<sub>2</sub>-½'»p  
 īēō Īō±«'»ōō Çōō Ī±0%<sub>2</sub>ō Īōō P'±ō Pōō Yō--r<sub>2</sub>z<sub>2</sub>ō Ōōō Y<sub>2</sub>z<sub>2</sub>''z<sub>2</sub>0%Yz<sub>2</sub>«--»ō Yōō Ē»<sub>2</sub>z<sub>2</sub>ō Ōō Ōōō  
 z<sub>2</sub>% Īz<sub>2</sub>±«'ō Īō ōīōōōī÷ō Ō P-±' Y<sub>2</sub>»<sup>3</sup> īēççī÷ō īōīēōīōēī  
 īēō Ōz<sub>2</sub>»«'ō Ō''»ōō Bōō Ōōō ō»<sup>3</sup> z<sub>2</sub>.2<sup>1</sup>ō Ūō Ōōō P'±ō Pōō Ū0z<sub>2</sub>±«'»-ō Īōō z<sub>2</sub>% Īz<sub>2</sub>±«'ō Īō ōīōōō÷ō  
 Ō±«0z<sub>2</sub>'±<sup>o</sup> Ō»«0±-½-»<sup>2</sup>½» īēōī÷ō ēīīōēīç  
 īçō Īz<sub>2</sub>±«'ō Īō ōīōōō÷ō P-±ō Y<sub>2</sub>'' çēō ēçōēē  
 īōō Ū»00±ō Ōōō Ī»<sup>1.2</sup>»«0-2ōP»<sup>0</sup>2šō Ūōō Ī±''z<sub>2</sub>%ō Ōōō Y<sub>2</sub>z<sub>2</sub>°'ō Bōō Īz<sub>2</sub>'<sup>a</sup>-ō Ūōō Ūz<sub>2</sub>0-2ō Ōōō z<sub>2</sub>%  
 Ō±šz<sub>2</sub>0%ō Ōō ōīōōō÷ō Ū'»<sub>2</sub>0±° ±0»--- īīōīē÷ō īēīēōīēīē  
 ī īō Ī±¼%ō xōō Īz<sub>2</sub>0±0%ō ðō Ōōō Ū0z<sub>2</sub>°»ōō Ō±0<sup>1</sup>z<sub>2</sub>ō Ōō Bōō Ō¼x<sup>2</sup>-±-ō Īōō Pz<sub>2</sub>2%0-¼<sup>1</sup>»ō Īōō  
 Ū-½µ<sup>2</sup>-±<sup>2</sup>ō ðōō Ōz<sub>2</sub>°<sup>3</sup> z<sub>2</sub>0-ō Ōōō Īz<sub>2</sub>-z<sub>2</sub>0-¼-ō Ōōō ō«<sup>11.2</sup>-ō Ōōō Ōōō Ī<sup>1</sup>»<sub>2</sub>ō ðō Ōōō z<sub>2</sub>% ð±0»''ō  
 Īō Ōō ōīōōōī÷ō x<sup>3</sup> z<sub>2</sub> z<sub>2</sub>±1š īīīōī÷ō ēēōēç  
 ī īō Ī<sub>2</sub>-¼z<sub>2</sub>ō ōōō Çz<sub>2</sub>° z<sub>2</sub>¼z<sub>2</sub>ō Ōōō Ō-!«<sup>2</sup>±ō Īōō Ç±0-µz<sub>2</sub>0z<sub>2</sub>ō Yōō Īz<sub>2</sub>µz<sub>2</sub>z<sub>2</sub>-ō ōōō Īz<sub>2</sub>±ō ōōō  
 Ō-r<sub>2</sub>«0z<sub>2</sub>ō Çōō z<sub>2</sub>% Ōz<sub>2</sub>µ-ō Ōō ōīōōōī÷ō Ō P-±½<sub>2</sub>»<sup>3</sup> ōĪ±µš±÷ īīēōī÷ō īīēōīēē  
 ī īō Ū0z<sub>2</sub>±«'»-ō Īōō ō»<sup>3</sup> z<sub>2</sub>.2<sup>1</sup>ō Ūō Ōōō Ōz<sub>2</sub>»«'ō Bōō Ōōō Yō--r<sub>2</sub>z<sub>2</sub>ō Ōōō z<sub>2</sub>% Īz<sub>2</sub>±«'ō Īō ōīōōōī÷ō Ū<sup>2</sup>»  
 Ū''<sup>o</sup> ðz<sub>2</sub>»<sup>0</sup>2- īōī÷ō īīçōīīīō  
 ī īō P«<sup>3</sup>ō Ōō Ōōō ōz<sub>2</sub>½µ»<sup>r</sup>ō Ōōō ō«<sup>1</sup>«<sup>2.2</sup>ō Ōōō Ī-<sub>2</sub>z<sub>2</sub>1-0-ō Īōō P0z<sub>2</sub>¼šō Ōōō Y<sub>2</sub>»<sub>2</sub>ō ðōō Ū»<sup>0</sup>2<sup>1</sup>ō Yōō  
 Ū0z<sub>2</sub>2µ<sup>2</sup>-ō Īōō Ū<sub>2</sub>z<sub>2</sub>š«00 Īōō Ō-ō ðōō z<sub>2</sub>% »<sub>2</sub> z<sub>2</sub>ō ōīççç÷ō Īz<sub>2</sub>»<sup>2</sup>½» īēççēīīī÷ō īēēōīēēē  
 īēō Īz<sub>2</sub>±ō Īō Ēōō ð±µ-z<sub>2</sub>šō Ōō Īōō Yz<sub>2</sub>-Ō±ōŃ%0»<sup>1</sup>±<sup>2</sup>ō Īōō Īz<sub>2</sub>''<sup>2.1</sup>ō Pōō Ī±0» Īō ōōō ¼'» Ī-±ō Ūōō  
 Ū-¼-±<sup>2</sup>ō Pō Ēōō Ū''»0%šō ōō Ōōō z<sub>2</sub>% P0%<sub>2</sub>»<sup>2</sup>ō Ūō Ūō ōīōōōī÷ō Ō P-±' Y<sub>2</sub>»<sup>3</sup> īēççī÷ō īēēō  
 īēē  
 īēō Ō«Ī-±ō Ōōō Y<sub>2</sub>»<sup>2.2</sup>z<sub>2</sub>šz<sub>2</sub>ō Bōō Ōōō Ō-½<sub>2</sub>µ»<sup>o</sup> Ūō Yōō ŃñĪ±«0µ»ō Ōōō Ī<sub>2</sub>»<sup>a</sup>½<sub>2</sub>»<sup>2</sup>µ±ō Bōō Ō-ō Ōōō  
 Īz<sub>2</sub>°<sup>o</sup>¼-ō Yōō P0»<sup>r</sup>ō Ōō Ūōō Ēz<sub>2</sub>°<sup>2.1</sup>ō Ōōō Ū»<sup>2.1</sup>ō Īōō Ōz<sub>2</sub>2<sup>2</sup>ō Ōōō Ō0z<sub>2</sub>°<sup>3</sup> z<sub>2</sub>»ō ðō ōōō ð»<sup>r</sup>ōō Ōō  
 Ūōō z<sub>2</sub>% Ū''-ō Ēō Ōō ōīççç÷ō Y<sub>2</sub>'' ēēōē÷ō ēīēōēīē  
 īēō Ō-½<sub>2</sub>»<sub>2</sub>«'ō Ńōō z<sub>2</sub>% Ī-½<sub>2</sub>±<sup>o</sup>ō Ōō ōīōōōī÷ō Y<sub>2</sub>'' īīīōī÷ō īēīōīçō  
 īēō Ū«Ī-r<sub>2</sub>ō ōōō Çz<sub>2</sub>° z<sub>2</sub>z<sub>2</sub>µz<sub>2</sub>ō Ōōō x<sup>3</sup> z<sub>2</sub>°<sup>3</sup> «0z<sub>2</sub>ō Ōōō Īz<sub>2</sub>z<sub>2</sub>µz<sub>2</sub>ō Çōō Ōz<sub>2</sub>0z<sub>2</sub>ō Bōō Ç±-<sub>2</sub>-<sup>3</sup>±0-ō Īōō Ç±µ±z<sub>2</sub>ō  
 Īōō z<sub>2</sub>% ō-<sup>3</sup>»<sup>2</sup>±ō Ōō ōīōōōī÷ō Ō Y<sub>2</sub>'' Īz<sub>2</sub>- īīēōō- ī÷ō īōīōīīī  
 īçō Ō-2ō Ēōō z<sub>2</sub>% Ū'ōŪ»<sup>0</sup>šō Ēō Īō ōīōōō÷ō Ō±' Y<sub>2</sub>'' P-±' īēōīī÷ō ēīēōēīē  
 īōō Īz<sub>2</sub>±«'ō Yōō ð»<sup>r</sup> z<sub>2</sub>2<sup>2</sup>ō Pōō z<sub>2</sub>% ō»<sup>2</sup>½»<sup>0</sup>±<sup>2</sup>ō Yō Ūō ōīōōō÷ō Y«00 Ń<sup>o</sup>.2 Ō»«0±¼-±' īōōī÷ō  
 īīīōīēē  
 ī īō Ī¼'»ō Ūōō P¼<sub>2</sub>z<sub>2</sub>¼»ō Yōō Ēšz<sub>2</sub>-ō Īōō z<sub>2</sub>% Ī0-''»ōō Bō ōīōōōī÷ō Ō Ō»«0±-½- īīçç÷ō īīēōīēēōīēō  
 ī īō Ē0-¼'»ō Ōō Bōō z<sub>2</sub>% Īz<sub>2</sub>¼'»ō Ūō Ōō ōīççç÷ō Bz<sub>2</sub>z<sub>2</sub>- Ū<sup>3</sup>µš±' ðP»<sup>0</sup>÷ īçīōī÷ō īōīō  
 ī īō Ōz<sub>2</sub>0-r<sub>2</sub>ō Īōō Ō-<sub>2</sub>-<sup>3</sup>«0z<sub>2</sub>ō Īōō Ç±-<sub>2</sub>-!z<sub>2</sub>µ-ō Ōōō z<sub>2</sub>% Īz<sub>2</sub>-šz<sub>2</sub>° z<sub>2</sub>ō Īō ōīōōō÷ō Ū''<sup>o</sup> Y<sub>2</sub>'' Ī-  
 īōīōī÷ō īēēōīēē  
 ī īō ¼'» Ūz<sub>2</sub>--z<sub>2</sub>0-ō Bōō Ū»<sup>3</sup>.2z<sub>2</sub>0%ō Yōō Ū»<sup>a</sup>0»ōō Pōō Īz<sub>2</sub>°±±ō Ūōō z<sub>2</sub>% Ē-¼z<sub>2</sub>ō Ōō ōīōōōī÷ō P'±±¼  
 īōīōī÷ō īīīēōīīīī  
 īēō ōz<sub>2</sub>0z<sub>2</sub>0-ō Ūō xōō Ī±«<sub>2</sub>z<sub>2</sub>-ō Ūō Ōōō Y«-ō Ēōō Ç«ō Ēō Ōō P«¼µ'»šō Yōō Ōz<sub>2</sub>'»ōō Ōōō z<sub>2</sub>% Ō»<sup>a.2</sup>»ō  
 Īō Ōō ōīōōōī÷ō ð0±½ Ōz<sub>2</sub>-' Bz<sub>2</sub>¼¼ Īz<sub>2</sub>- Ē Ī B īōīōē÷ō īīççōīīōī  
 īēō ōz<sub>2</sub>-»<sup>1</sup>z<sub>2</sub>0z<sub>2</sub>ō Çōō z<sub>2</sub>% P±2z<sub>2</sub>°-¼z<sub>2</sub>ō Pō ōīççç÷ō Ō x<sup>3</sup> z<sub>2</sub>°<sup>3</sup> «<sup>2</sup>±' īīīōē÷ō īēēōīēēē  
 īēō Ō½Ūz<sub>2</sub>0z<sub>2</sub>»ō Īō Ōōō Bz<sub>2</sub>¼»<sup>0</sup>-±<sup>2</sup>ō ōō Ōōō Ī«¼µ»ōō Īō Ōōō Ō°<sup>o</sup>ō Ńō Ōōō z<sub>2</sub>% Ōz<sub>2</sub>½Ū0z<sub>2</sub>° Ūō Ōō  
 ōīōōōī÷ō Ō±' Y<sub>2</sub>'' P-±½<sub>2</sub>»<sup>3</sup> īīīōīōī÷ō īçōīē  
 īēō P''<sup>±</sup>±ō Ūōō ð»<sup>0</sup>±r<sup>o</sup>ō Ōōō Īz<sub>2</sub>¼'»ō Ūōō Ō-0z<sub>2</sub>¼'»-ō Ūōō Ū-2z<sub>2</sub>0%ō Ūōō Ō-½±r<sub>2</sub>»<sup>0</sup>z<sub>2</sub>ō ðōō z<sub>2</sub>%  
 Ń00»<sup>2</sup>-«-ō Īō ōīççç÷ō Yz<sub>2</sub>2½'» Ī»- ēīēō÷ō īīīōīēē  
 īçō Ō±2<sup>1</sup>ō Īō Ōōō Ū«<sup>2.1</sup>ō Ōō ðōō Y<sub>2</sub>±šō Çō Ōōō z<sub>2</sub>% Ō»<sup>0</sup>»ō Yō Çō ōīççç÷ō Ń<sup>2</sup>½±<sup>1</sup>š ēīōī÷ō ēēōēī  
 īōō Ū0z<sub>2</sub>°»ō Ūō Ēōō ōz<sub>2</sub>00-ō Ēō Ūōō Y«<sup>a</sup>»ōō Yō Bōō z<sub>2</sub>% Ōz<sub>2</sub>-r<sub>2</sub>»ōō Īō Ōō ōīōōōī÷ō Ō x<sup>3</sup> z<sub>2</sub>°<sup>3</sup> «<sup>2</sup>±'  
 īēīōī÷ō īīīēōīīīī  
 ī īō Īz<sub>2</sub>-±ō Ōōō ōz<sub>2</sub>2-±<sup>2</sup>ō ðō xōō z<sub>2</sub>% Īz<sub>2</sub>'»<sup>2.1</sup>»ōō ðō ōīōōō÷ō Ō P-±' Y<sub>2</sub>»<sup>3</sup> īēīōīē÷ō īēīōēō  
 īēīōīīī



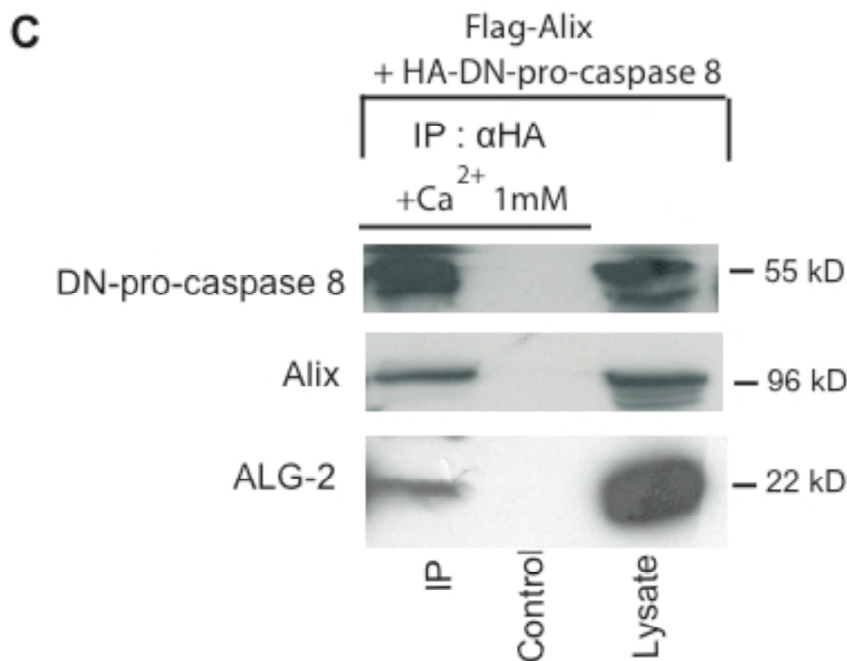
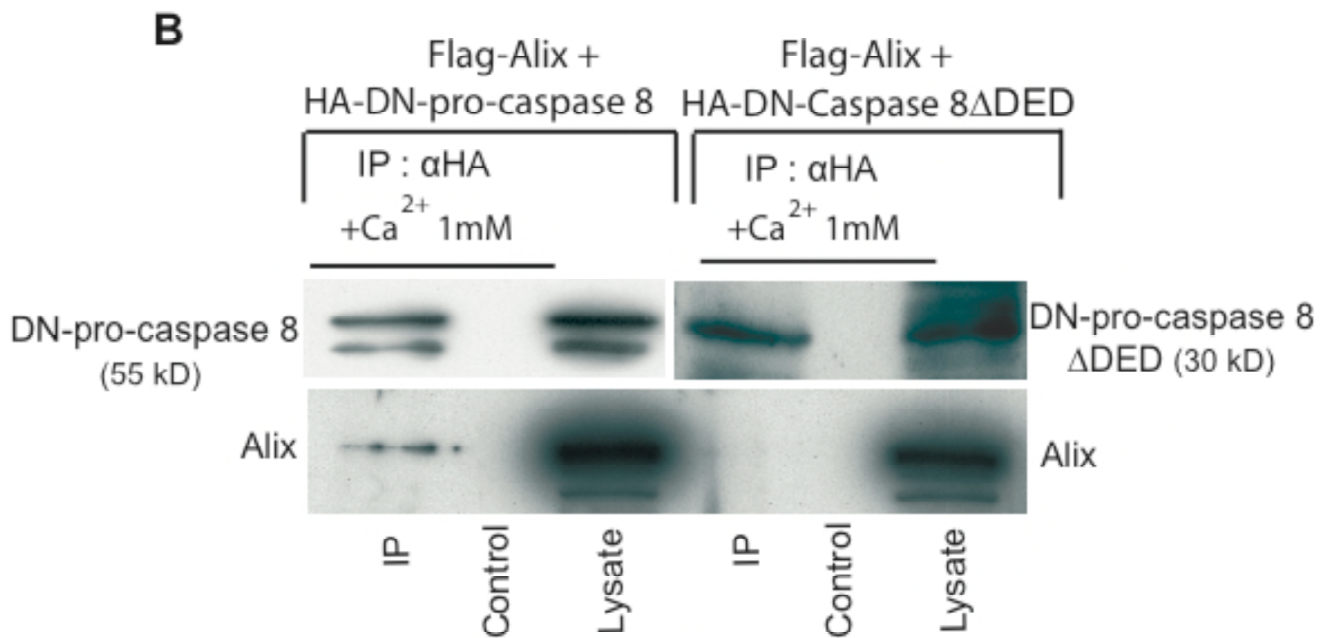
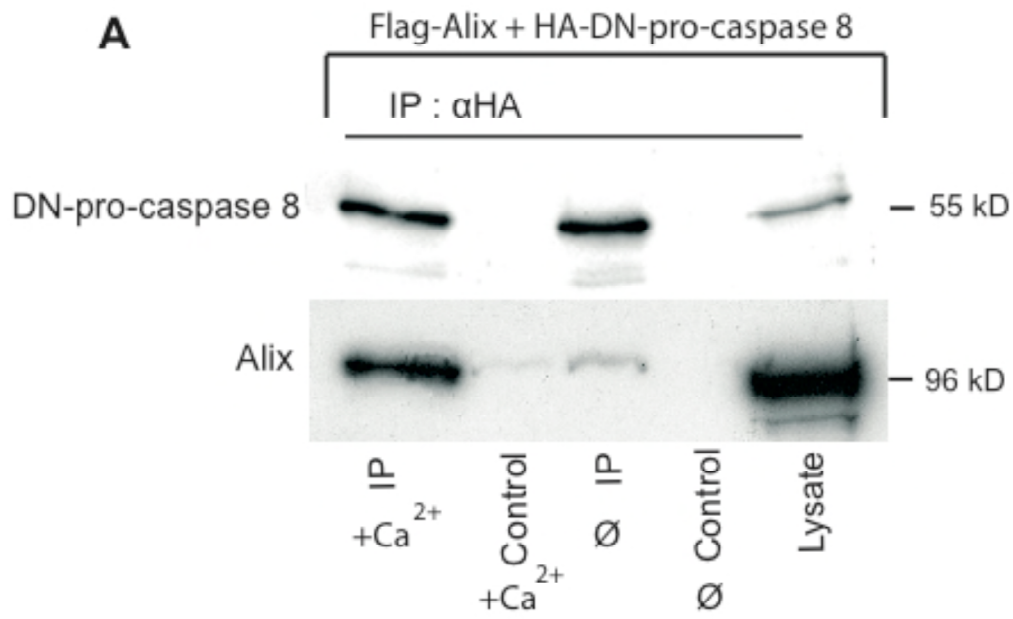




Figure 1

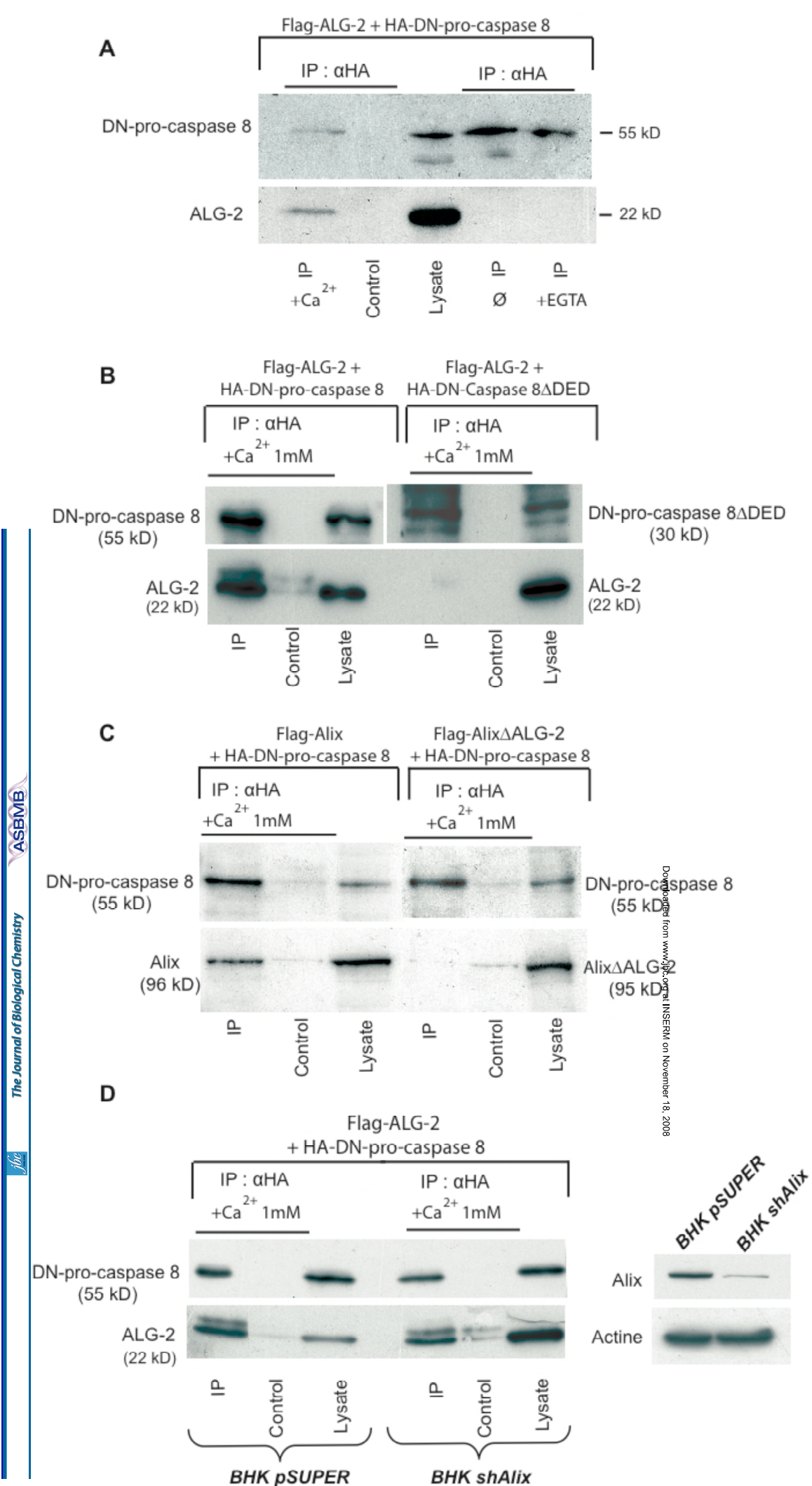


**Figure 2**

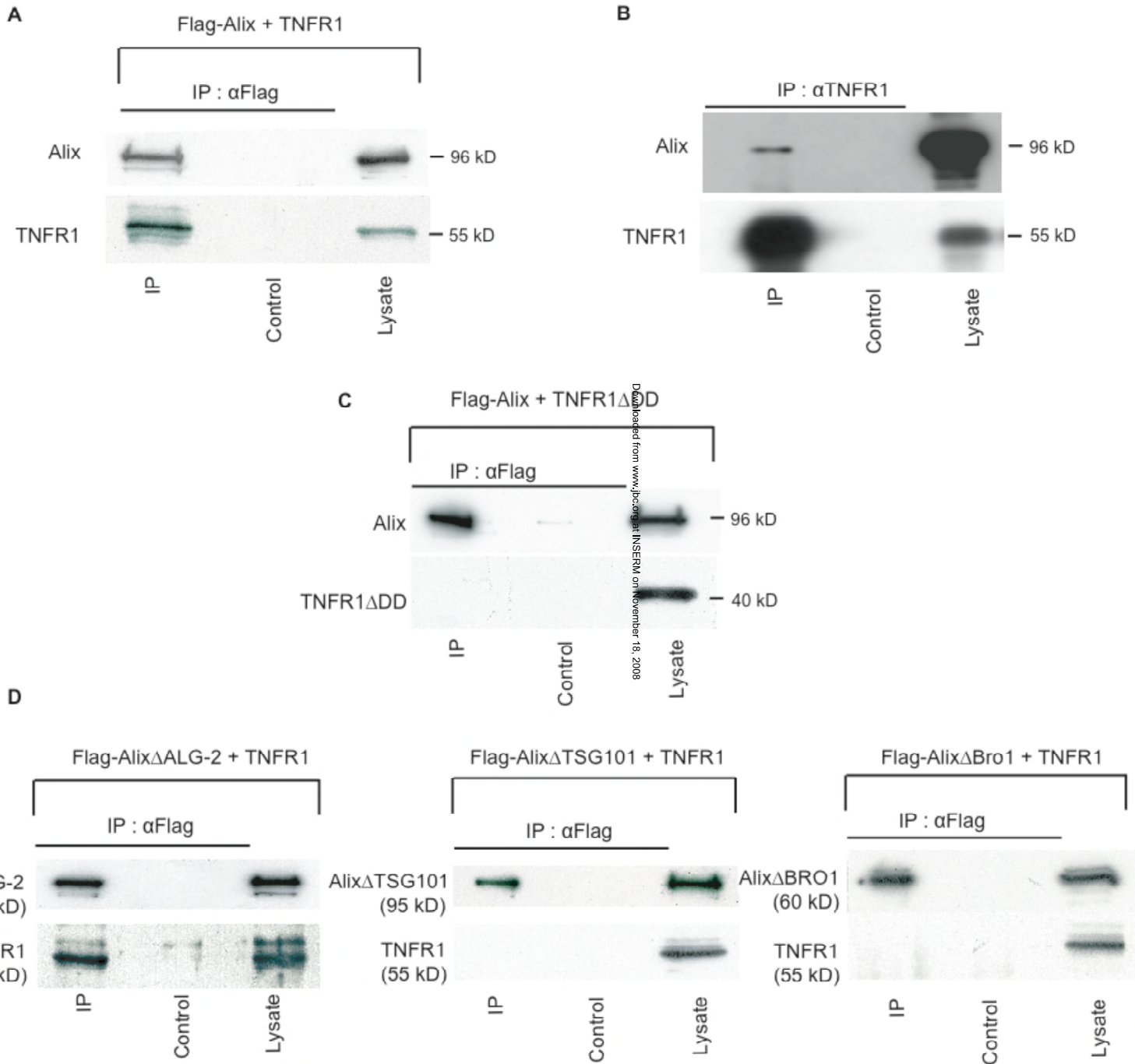




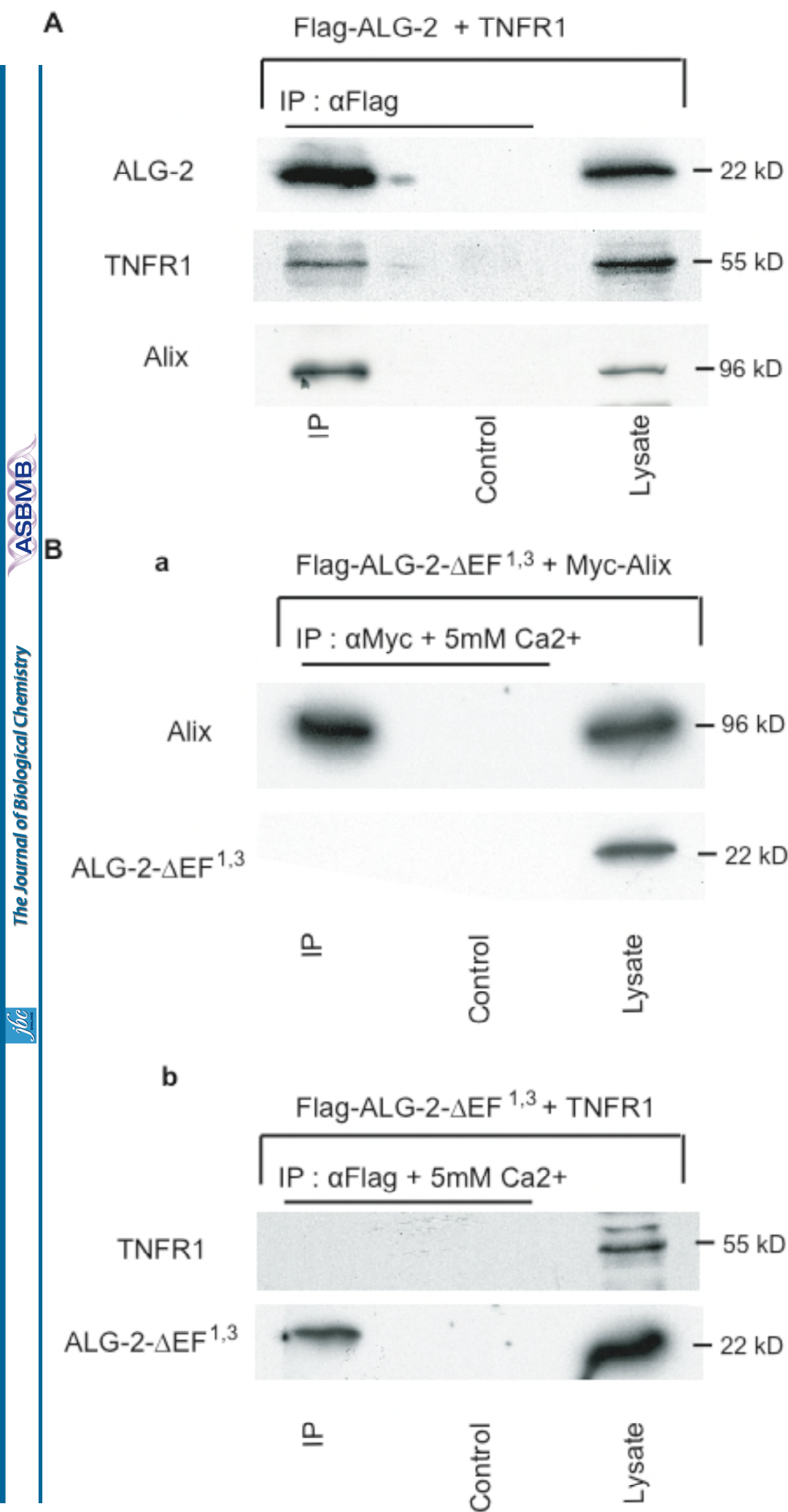
**Figure 3**



**Figure 4**

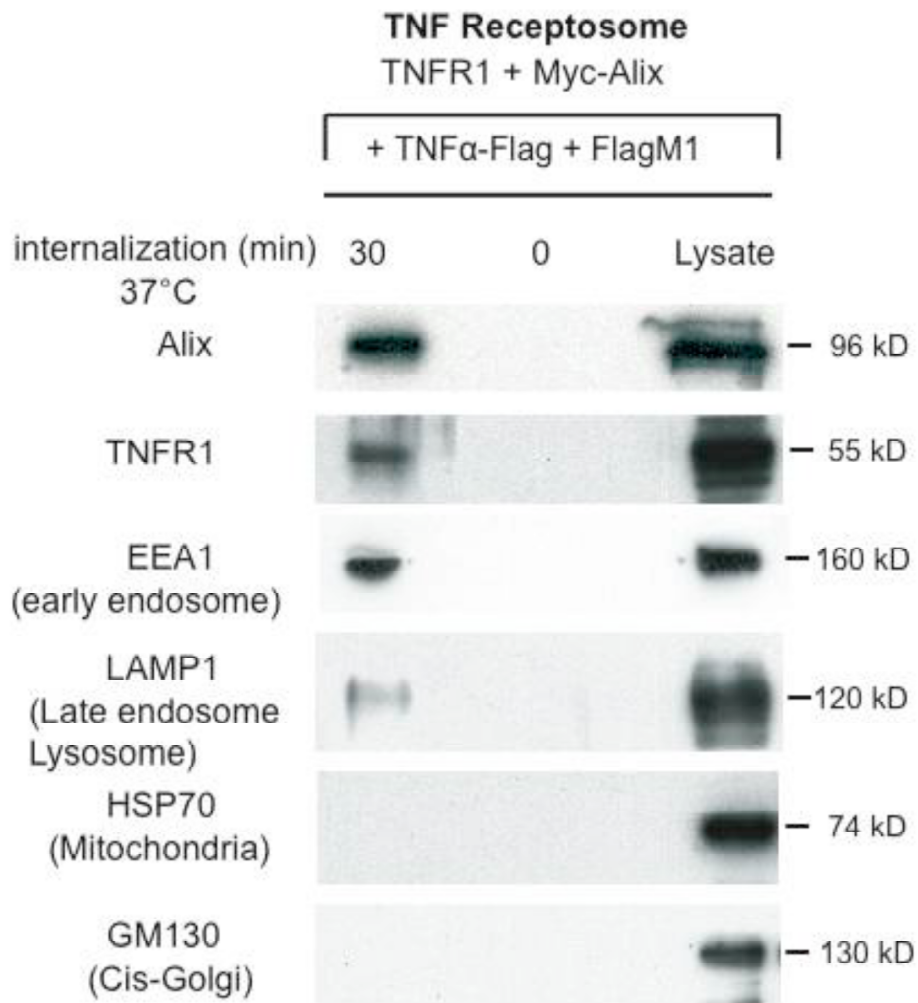


# Figure 5



# Figure 6

**A**



**B**

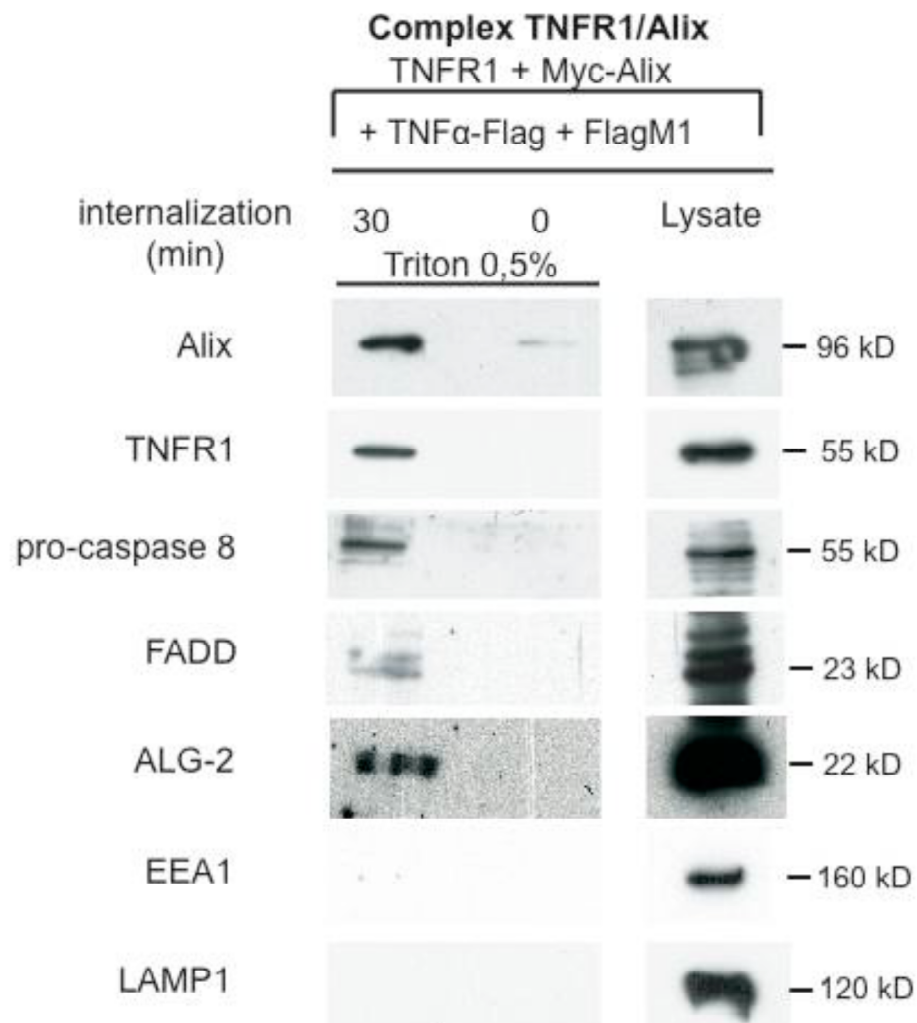
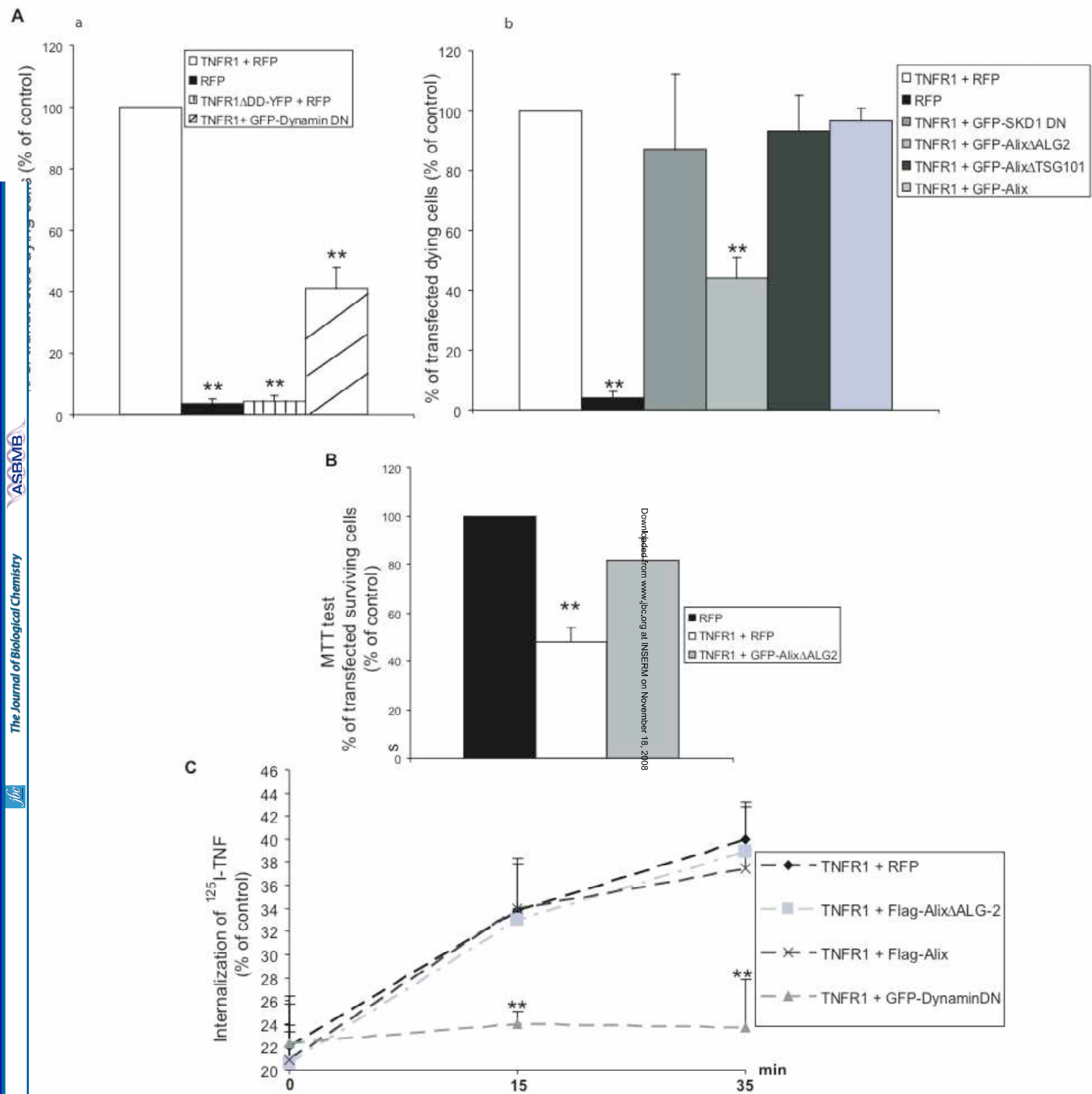


Figure 7



# Figure 8

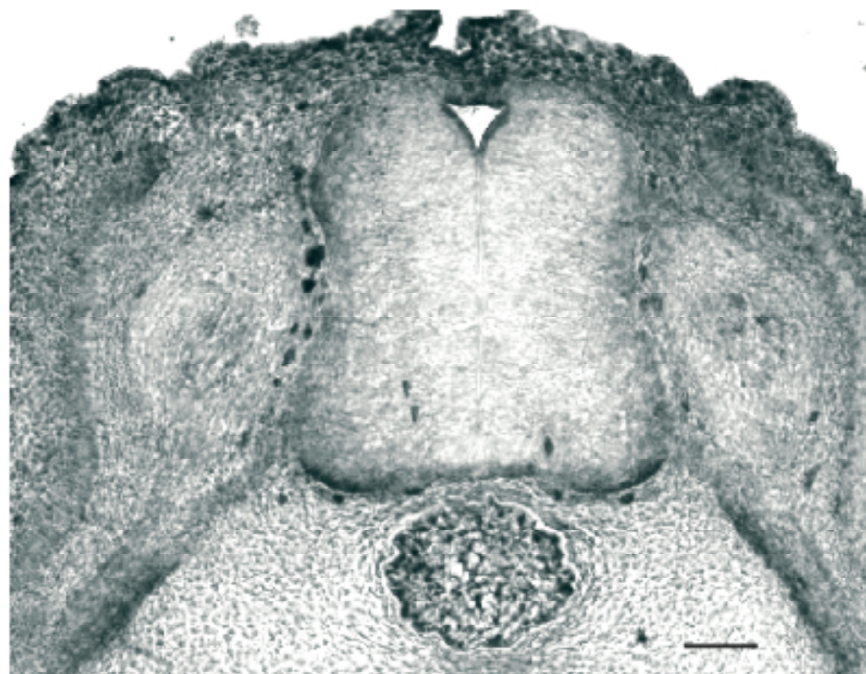
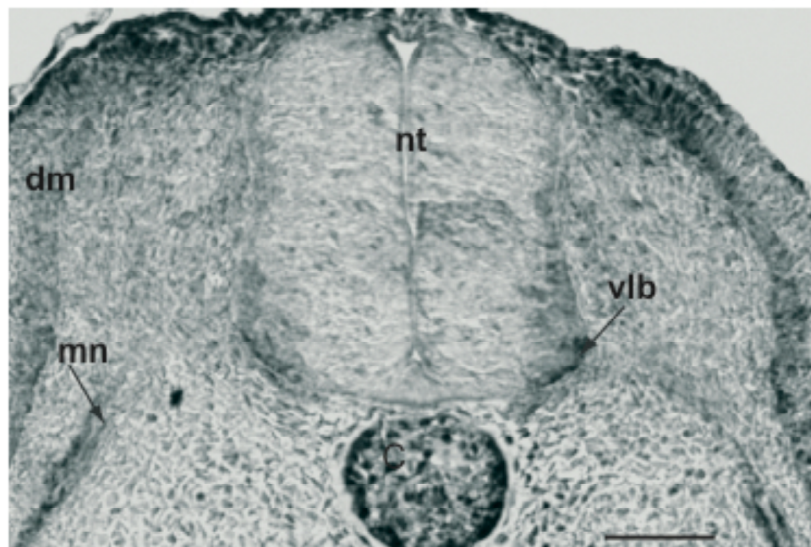
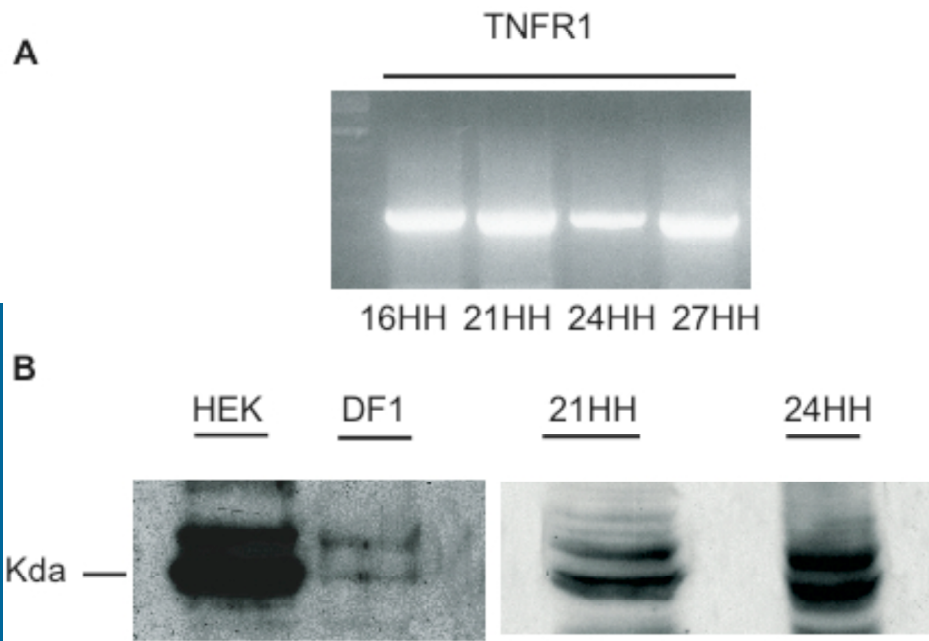
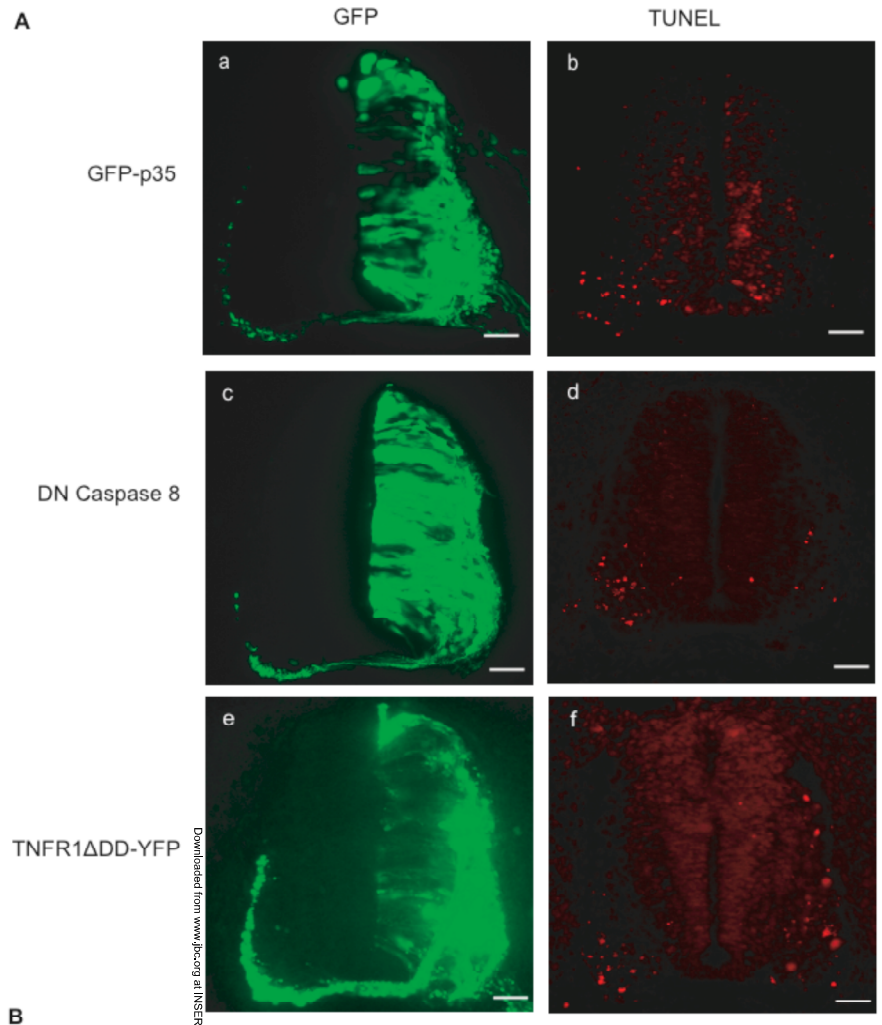
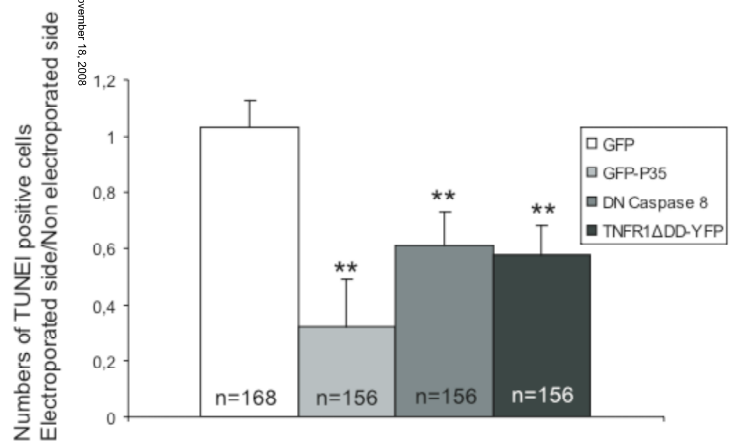


Figure 9



**B**



# **Bibliographie**



## A

- Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D. G., Heuser, J. E., Wang, X. and Akey, C. W.** (2002). Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* **9**, 423-32.
- Adam-Klages, S., Adam, D., Wiegmann, K., Struve, S., Kolanus, W., Schneider-Mergener, J. and Kronke, M.** (1996). FAN, a novel WD-repeat protein, couples the p55 TNF-receptor to neutral sphingomyelinase. *Cell* **86**, 937-47.
- Adam, D., Wiegmann, K., Adam-Klages, S., Ruff, A. and Kronke, M.** (1996). A novel cytoplasmic domain of the p55 tumor necrosis factor receptor initiates the neutral sphingomyelinase pathway. *J Biol Chem* **271**, 14617-22.
- Adrain, C., Creagh, E. M. and Martin, S. J.** (2001). Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. *Embo J* **20**, 6627-36.
- Adrain, C. and Martin, S. J.** (2001). The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci* **26**, 390-7.
- Akao, Y., Otsuki, Y., Kataoka, S., Ito, Y. and Tsujimoto, Y.** (1994). Multiple subcellular localization of bcl-2: detection in nuclear outer membrane, endoplasmic reticulum membrane, and mitochondrial membranes. *Cancer Res* **54**, 2468-71.
- Algeciras-Schimmich, A., Shen, L., Barnhart, B. C., Murmann, A. E., Burkhardt, J. K. and Peter, M. E.** (2002). Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol Cell Biol* **22**, 207-20.
- Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W. and Yuan, J.** (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* **87**, 171.
- Altman, J. and Bayer, S. A.** (1984). The development of the rat spinal cord. *Adv Anat Embryol Cell Biol* **85**, 1-164.
- Ambrosini, G., Adida, C. and Altieri, D. C.** (1997). A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* **3**, 917-21.
- Anglade, P., Vyas, S., Javoy-Agid, F., Herrero, M. T., Michel, P. P., Marquez, J., Mouatt-Prigent, A., Ruberg, M., Hirsch, E. C. and Agid, Y.** (1997). Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol Histopathol* **12**, 25-31.
- Arakawa, Y., Sendtner, M. and Thoenen, H.** (1990). Survival effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on chick embryonic motoneurons in culture: comparison with other neurotrophic factors and cytokines. *J Neurosci* **10**, 3507-15.
- Arst, H. N. and Penalva, M. A.** (2003). pH regulation in *Aspergillus* and parallels with higher eukaryotic regulatory systems. *Trends Genet* **19**, 224-31.
- Ashkenazi, A. and Dixit, V. M.** (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**, 1305-8.
- Ayala, V., Casas, C., Ribera, J., Caldero, J., Oppenheim, R. W. and Esquerda, J. E.** (1999). Specific association of c-Jun-like immunoreactivity but not c-Jun p39 with normal and induced programmed cell death in the chick embryo. *J Neurobiol* **38**, 171-90.

## B

- Baehrecke, E. H.** (2005). Autophagy: dual roles in life and death? *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 505-10.
- Baliga, B. C., Colussi, P. A., Read, S. H., Dias, M. M., Jans, D. A. and Kumar, S.** (2003). Role of prodomain in importin-mediated nuclear localization and activation of caspase-2. *J Biol Chem* **278**, 4899-905.
- Ballou, L. R., Lauderkind, S. J., Rosloniec, E. F. and Raghov, R.** (1996). Ceramide signalling and the immune response. *Biochim Biophys Acta* **1301**, 273-87.
- Bamji, S. X., Majdan, M., Pozniak, C. D., Belliveau, D. J., Aloyz, R., Kohn, J., Causing, C. G. and Miller, F. D.** (1998). The p75 neurotrophin receptor mediates neuronal apoptosis and is essential for naturally occurring sympathetic neuron death. *J Cell Biol* **140**, 911-23.
- Banner, D. W., D'Arcy, A., Janes, W., Gentz, R., Schoenfeld, H. J., Broger, C., Loetscher, H. and Lesslauer, W.** (1993). Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* **73**, 431-45.
- Barde, Y. A., Edgar, D. and Thoenen, H.** (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *Embo J* **1**, 549-53.
- Barker, V., Middleton, G., Davey, F. and Davies, A. M.** (2001). TNFalpha contributes to the death of NGF-dependent neurons during development. *Nat Neurosci* **4**, 1194-8.
- Basyuk, E., Galli, T., Mougel, M., Blanchard, J. M., Sitbon, M. and Bertrand, E.** (2003). Retroviral genomic RNAs are transported to the plasma membrane by endosomal vesicles. *Dev Cell* **5**, 161-74.
- Bayer, S. A., Zhang, X., Russo, R. J. and Altman, J.** (1994). Three-dimensional reconstructions of the developing forebrain in rat embryos. *Neuroimage* **1**, 296-307.
- Berkemeier, L. R., Winslow, J. W., Kaplan, D. R., Nikolics, K., Goeddel, D. V. and Rosenthal, A.** (1991). Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. *Neuron* **7**, 857-66.
- Bertin, J., Armstrong, R. C., Otilie, S., Martin, D. A., Wang, Y., Banks, S., Wang, G. H., Senkevich, T. G., Alnemri, E. S., Moss, B. et al.** (1997). Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNFR1-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 1172-6.
- Bessis, A., Bernard, D. and Triller, A.** (2005). Tumor necrosis factor-alpha and neuronal development. *Neuroscientist* **11**, 277-81.

- Bezombes, C., Segui, B., Cuvillier, O., Bruno, A. P., Uro-Coste, E., Gouaze, V., Andrieu-Abadie, N., Carpentier, S., Laurent, G., Salvayre, R. et al.** (2001). Lysosomal sphingomyelinase is not solicited for apoptosis signaling. *Faseb J* **15**, 297-9.
- Blum, D., Hemming, F. J., Galas, M. C., Torch, S., Cuvelier, L., Schiffmann, S. N. and Sadoul, R.** (2004). Increased Alix (apoptosis-linked gene-2 interacting protein X) immunoreactivity in the degenerating striatum of rats chronically treated by 3-nitropropionic acid. *Neurosci Lett* **368**, 309-13.
- Bogler, O., Furnari, F. B., Kindler-Roehrborn, A., Sykes, V. W., Yung, R., Huang, H. J. and Cavenee, W. K.** (2000). SETA: a novel SH3 domain-containing adapter molecule associated with malignancy in astrocytes. *Neuro-oncol* **2**, 6-15.
- Boldin, M. P., Goncharov, T. M., Goltsev, Y. V. and Wallach, D.** (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* **85**, 803-15.
- Boldin, M. P., Mett, I. L., Varfolomeev, E. E., Chumakov, I., Shemer-Avni, Y., Camonis, J. H. and Wallach, D.** (1995a). Self-association of the "death domains" of the p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor and Fas/APO1 prompts signaling for TNF and Fas/APO1 effects. *J Biol Chem* **270**, 387-91.
- Boldin, M. P., Varfolomeev, E. E., Pancer, Z., Mett, I. L., Camonis, J. H. and Wallach, D.** (1995b). A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem* **270**, 7795-8.
- Bossy-Wetzel, E., Newmeyer, D. D. and Green, D. R.** (1998). Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *Embo J* **17**, 37-49.
- Bouchier-Hayes, L. and Martin, S. J.** (2002). CARD games in apoptosis and immunity. *EMBO Rep* **3**, 616-21.
- Bredesen, D. E., Mehlen, P. and Rabizadeh, S.** (2005). Receptors that mediate cellular dependence. *Cell Death Differ* **12**, 1031-43.
- Brenner, C., Marzo, I. and Kroemer, G.** (1998). A revolution in apoptosis: from a nucleocentric to a mitochondriocentric perspective. *Exp Gerontol* **33**, 543-53.
- Brown, B. K. and Song, W.** (2001). The actin cytoskeleton is required for the trafficking of the B cell antigen receptor to the late endosomes. *Traffic* **2**, 414-27.
- Brunet, N., Tarabal, O., Portero-Otin, M., Oppenheim, R. W., Esquerda, J. E. and Caldero, J.** (2007). Survival and death of mature avian motoneurons in organotypic slice culture: Trophic requirements for survival and different types of degeneration. *J Comp Neurol* **501**, 669-90.
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X. and Wang, X.** (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**, 269-90.
- Bump, N. J., Hackett, M., Hugunin, M., Seshagiri, S., Brady, K., Chen, P., Ferez, C., Franklin, S., Ghayur, T., Li, P. et al.** (1995). Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science* **269**, 1885-8.
- Burek, M. J. and Oppenheim, R. W.** (1996). Programmed cell death in the developing nervous system. *Brain Pathol* **6**, 427-46.
- Byun, Y., Chen, F., Chang, R., Trivedi, M., Green, K. J. and Cryns, V. L.** (2001). Caspase cleavage of vimentin disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis. *Cell Death Differ* **8**, 443-50.

## C

- Cabezas, A., Bache, K. G., Brech, A. and Stenmark, H.** (2005). Alix regulates cortical actin and the spatial distribution of endosomes. *J Cell Sci* **118**, 2625-35.
- Caldero, J., Prevette, D., Mei, X., Oakley, R. A., Li, L., Milligan, C., Houenou, L., Burek, M. and Oppenheim, R. W.** (1998). Peripheral target regulation of the development and survival of spinal sensory and motor neurons in the chick embryo. *J Neurosci* **18**, 356-70.
- Cataldo, A. M., Barnett, J. L., Berman, S. A., Li, J., Quarless, S., Bursztajn, S., Lippa, C. and Nixon, R. A.** (1995). Gene expression and cellular content of cathepsin D in Alzheimer's disease brain: evidence for early up-regulation of the endosomal-lysosomal system. *Neuron* **14**, 671-80.
- Casaccia-Bonnet, P., Kong, H. and Chao, M. V.** (1998). Neurotrophins: the biological paradox of survival factors eliciting apoptosis. *Cell Death Differ* **5**, 357-64.
- Chai, J., Du, C., Wu, J. W., Kyin, S., Wang, X. and Shi, Y.** (2000). Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* **406**, 855-62.
- Chan, F. K., Chun, H. J., Zheng, L., Siegel, R. M., Bui, K. L. and Lenardo, M. J.** (2000). A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* **288**, 2351-4.
- Chan, F. K., Shisler, J., Bixby, J. G., Felices, M., Zheng, L., Appel, M., Orenstein, J., Moss, B. and Lenardo, M. J.** (2003). A role for tumor necrosis factor receptor-2 and receptor-interacting protein in programmed necrosis and antiviral responses. *J Biol Chem* **278**, 51613-21.
- Chang, L., Kamata, H., Solinas, G., Luo, J. L., Maeda, S., Venuprasad, K., Liu, Y. C. and Karin, M.** (2006). The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNF $\alpha$ -induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover. *Cell* **124**, 601-13.
- Chatellard-Causse, C., Blot, B., Cristina, N., Torch, S., Missotten, M. and Sadoul, R.** (2002). Alix (ALG-2-interacting protein X), a protein involved in apoptosis, binds to endophilins and induces cytoplasmic vacuolization. *J Biol Chem* **277**, 29108-15.

- Che, S., El-Hodiri, H. M., Wu, C. F., Nelman-Gonzalez, M., Weil, M. M., Etkin, L. D., Clark, R. B. and Kuang, J.** (1999). Identification and cloning of xp95, a putative signal transduction protein in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* **274**, 5522-31.
- Cheema, Z. F., Wade, S. B., Sata, M., Walsh, K., Sohrabji, F. and Miranda, R. C.** (1999). Fas/Apo [apoptosis]-1 and associated proteins in the differentiating cerebral cortex: induction of caspase-dependent cell death and activation of NF-kappaB. *J Neurosci* **19**, 1754-70.
- Chen, B., Borinstein, S. C., Gillis, J., Sykes, V. W. and Bogler, O.** (2000). The glioma-associated protein SETA interacts with AIP1/Alix and ALG-2 and modulates apoptosis in astrocytes. *J Biol Chem* **275**, 19275-81.
- Chen, C. and Sytkowski, A. J.** (2005). Apoptosis-linked gene-2 connects the Raf-1 and ASK1 signalings. *Biochem Biophys Res Commun* **333**, 51-7.
- Chen, Y. R., Kori, R., John, B. and Tan, T. H.** (2001). Caspase-mediated cleavage of actin-binding and SH3-domain-containing proteins cortactin, HSL, and HIP-55 during apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **288**, 981-9.
- Chen, Z. J.** (2005). Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat Cell Biol* **7**, 758-65.
- Cheng, E. H., Kirsch, D. G., Clem, R. J., Ravi, R., Kastan, M. B., Bedi, A., Ueno, K. and Hardwick, J. M.** (1997). Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* **278**, 1966-8.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K. E., Corden, J. L., Westphal, H. and Beachy, P. A.** (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* **383**, 407-13.
- Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M. and Dixit, V. M.** (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* **81**, 505-12.
- Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Yu, G. L., Lyons, R. H., Garg, M., Duan, D. R., Xing, L., Gentz, R., Ni, J. and Dixit, V. M.** (1996a). Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science* **274**, 990-2.
- Chinnaiyan, A. M., Tepper, C. G., Seldin, M. F., O'Rourke, K., Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Krammer, P. H., Peter, M. E. and Dixit, V. M.** (1996b). FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem* **271**, 4961-5.
- Clarke, P. G.** (1990). Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl)* **181**, 195-213.
- Clem, R. J., Sheu, T. T., Richter, B. W., He, W. W., Thornberry, N. A., Duckett, C. S. and Hardwick, J. M.** (2001). c-IAP1 is cleaved by caspases to produce a proapoptotic C-terminal fragment. *J Biol Chem* **276**, 7602-8.
- Codogno, P. and Meijer, A. J.** (2005). Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ* **12 Suppl 2**, 1509-18.
- Cohen, S., Levi-Montalcini, R. and Hamburger, V.** (1954). A Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated From Sarcom As 37 And 180. *Proc Natl Acad Sci U S A* **40**, 1014-8.
- Coleman, M. L., Sahai, E. A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A. and Olson, M. F.** (2001). Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol* **3**, 339-45.
- Comella, J. X., Sanz-Rodriguez, C., Aldea, M. and Esquerda, J. E.** (1994). Skeletal muscle-derived trophic factors prevent motoneurons from entering an active cell death program in vitro. *J Neurosci* **14**, 2674-86.
- Cornillon, S., Foa, C., Davoust, J., Buonavista, N., Gross, J. D. and Golstein, P.** (1994). Programmed cell death in Dictyostelium. *J Cell Sci* **107 (Pt 10)**, 2691-704.
- Cregan, S. P., Fortin, A., MacLaurin, J. G., Callaghan, S. M., Cecconi, F., Yu, S. W., Dawson, T. M., Dawson, V. L., Park, D. S., Kroemer, G. et al.** (2002). Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *J Cell Biol* **158**, 507-17.
- Crompton, M.** (2000). Bax, Bid and the permeabilization of the mitochondrial outer membrane in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 414-9.
- Cuvillier, O., Nava, V. E., Murthy, S. K., Edsall, L. C., Levade, T., Milstien, S. and Spiegel, S.** (2001). Sphingosine generation, cytochrome c release, and activation of caspase-7 in doxorubicin-induced apoptosis of MCF7 breast adenocarcinoma cells. *Cell Death Differ* **8**, 162-71.

## D

- D'Adamio, L., Lacana, E. and Vito, P.** (1997). Functional cloning of genes involved in T-cell receptor-induced programmed cell death. *Semin Immunol* **9**, 17-23.
- Davies, A. M., Bandtlow, C., Heumann, R., Korsching, S., Rohrer, H. and Thoenen, H.** (1987). Timing and site of nerve growth factor synthesis in developing skin in relation to innervation and expression of the receptor. *Nature* **326**, 353-8.
- Davis, R. J.** (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**, 239-52.
- de Bilbao, F. and Dubois-Dauphin, M.** (1996). Time course of axotomy-induced apoptotic cell death in facial motoneurons of neonatal wild type and bcl-2 transgenic mice. *Neuroscience* **71**, 1111-9.
- de la Monte, S. M., Sohn, Y. K. and Wands, J. R.** (1997). Correlates of p53- and Fas (CD95)-mediated apoptosis in Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* **152**, 73-83.
- De Smaele, E., Zazzeroni, F., Papa, S., Nguyen, D. U., Jin, R., Jones, J., Cong, R. and Franzoso, G.** (2001). Induction of gadd45beta by NF-kappaB downregulates pro-apoptotic JNK signalling. *Nature* **414**, 308-13.
- de Thonel, A. and Eriksson, J. E.** (2005). Regulation of death receptors-Relevance in cancer therapies. *Toxicol Appl Pharmacol* **207**, 123-32.

- Deak, J. C., Cross, J. V., Lewis, M., Qian, Y., Parrott, L. A., Distelhorst, C. W. and Templeton, D. J.** (1998). Fas-induced proteolytic activation and intracellular redistribution of the stress-signaling kinase MEKK1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5595-600.
- Deckwerth, T. L., Elliott, J. L., Knudson, C. M., Johnson, E. M., Jr., Snider, W. D. and Korsmeyer, S. J.** (1996). BAX is required for neuronal death after trophic factor deprivation and during development. *Neuron* **17**, 401-11.
- Dejournett, R. E., Kobayashi, R., Pan, S., Wu, C., Etkin, L. D., Clark, R. B., Bogler, O. and Kuang, J.** (2007). Phosphorylation of the proline-rich domain of Xp95 modulates Xp95 interaction with partner proteins. *Biochem J* **401**, 521-31.
- del Peso, L., Gonzalez-Garcia, M., Page, C., Herrera, R. and Nunez, G.** (1997). Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* **278**, 687-9.
- Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S. and Reed, J. C.** (1997). X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* **388**, 300-4.
- Devon, R. S., Orban, P. C., Gerrow, K., Barbieri, M. A., Schwab, C., Cao, L. P., Helm, J. R., Bissada, N., Cruz-Aguado, R., Davidson, T. L. et al.** (2006). Als2-deficient mice exhibit disturbances in endosome trafficking associated with motor behavioral abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 9595-600.
- Duan, H. and Dixit, V. M.** (1997). RAIDD is a new 'death' adaptor molecule. *Nature* **385**, 86-9.
- Dubois-Dauphin, M., Frankowski, H., Tsujimoto, Y., Huarte, J. and Martinou, J. C.** (1994). Neonatal motoneurons overexpressing the bcl-2 protooncogene in transgenic mice are protected from axotomy-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 3309-13.
- Dunn, W. A., Jr.** (1990). Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. *J Cell Biol* **110**, 1923-33.
- Dupre, S., Volland, C. and Haguenaer-Tsapis, R.** (2001). Membrane transport: ubiquitylation in endosomal sorting. *Curr Biol* **11**, R932-4.

## E

- Earnshaw, W. C., Martins, L. M. and Kaufmann, S. H.** (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* **68**, 383-424.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. and Nagata, S.** (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **391**, 43-50.
- Erickson, S. L., de Sauvage, F. J., Kikly, K., Carver-Moore, K., Pitts-Meek, S., Gillett, N., Sheehan, K. C., Schreiber, R. D., Goeddel, D. V. and Moore, M. W.** (1994). Decreased sensitivity to tumour-necrosis factor but normal T-cell development in TNF receptor-2-deficient mice. *Nature* **372**, 560-3.
- Ericson, J., Morton, S., Kawakami, A., Roelink, H. and Jessell, T. M.** (1996). Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell* **87**, 661-73.
- Ericson, J., Rashbass, P., Schedl, A., Brenner-Morton, S., Kawakami, A., van Heyningen, V., Jessell, T. M. and Briscoe, J.** (1997). Pax6 controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded Shh signaling. *Cell* **90**, 169-80.
- Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B. and Martinou, J. C.** (2000). Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* **20**, 929-35.

## F

- Farlie, P. G., Dringen, R., Rees, S. M., Kannourakis, G. and Bernard, O.** (1995). bcl-2 transgene expression can protect neurons against developmental and induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4397-401.
- Felderhoff-Mueser, U., Taylor, D. L., Greenwood, K., Kozma, M., Stibenz, D., Joashi, U. C., Edwards, A. D. and Mehmet, H.** (2000). Fas/CD95/APO-1 can function as a death receptor for neuronal cells in vitro and in vivo and is upregulated following cerebral hypoxic-ischemic injury to the developing rat brain. *Brain Pathol* **10**, 17-29.
- Ferri, C. C., Moore, F. A. and Bisby, M. A.** (1998). Effects of facial nerve injury on mouse motoneurons lacking the p75 low-affinity neurotrophin receptor. *J Neurobiol* **34**, 1-9.
- Fisher, R. D., Chung, H. Y., Zhai, Q., Robinson, H., Sundquist, W. I. and Hill, C. P.** (2007). Structural and biochemical studies of ALIX/AIP1 and its role in retrovirus budding. *Cell* **128**, 841-52.
- Fischer, U., Janicke, R. U. and Schulze-Osthoff, K.** (2003). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* **10**, 76-100.
- Frade, J. M. and Barde, Y. A.** (1999). Genetic evidence for cell death mediated by nerve growth factor and the neurotrophin receptor p75 in the developing mouse retina and spinal cord. *Development* **126**, 683-90.
- Francois, F., Godinho, M. J. and Grimes, M. L.** (2000). CREB is cleaved by caspases during neural cell apoptosis. *FEBS Lett* **486**, 281-4.
- Fujita, H., Yamanaka, M., Imamura, K., Tanaka, Y., Nara, A., Yoshimori, T., Yokota, S. and Himeno, M.** (2003). A dominant negative form of the AAA ATPase SKD1/VPS4 impairs membrane trafficking out of endosomal/lysosomal compartments: class E vps phenotype in mammalian cells. *J Cell Sci* **116**, 401-14.
- Futai, E., Kubo, T., Sorimachi, H., Suzuki, K. and Maeda, T.** (2001). Molecular cloning of PalBH, a mammalian homologue of the *Aspergillus* atypical calpain PalB. *Biochim Biophys Acta* **1517**, 316-9.

## G

- Gaeta, M. L., Johnson, D. R., Kluger, M. S. and Pober, J. S.** (2000). The death domain of tumor necrosis factor receptor 1 is necessary but not sufficient for Golgi retention of the receptor and mediates receptor desensitization. *Lab Invest* **80**, 1185-94.
- Gagliardini, V., Fernandez, P. A., Lee, R. K., Drexler, H. C., Rotello, R. J., Fishman, M. C. and Yuan, J.** (1994). Prevention of vertebrate neuronal death by the crmA gene. *Science* **263**, 826-8.
- Gervais, F. G., Xu, D., Robertson, G. S., Vaillancourt, J. P., Zhu, Y., Huang, J., LeBlanc, A., Smith, D., Rigby, M., Shearman, M. S. et al.** (1999). Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid-beta precursor protein and amyloidogenic A beta peptide formation. *Cell* **97**, 395-406.
- Ghosh, S., May, M. J. and Kopp, E. B.** (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* **16**, 225-60.
- Goldberg, Y. P., Nicholson, D. W., Rasper, D. M., Kalchman, M. A., Koide, H. B., Graham, R. K., Bromm, M., Kazemi-Esfarjani, P., Thornberry, N. A., Vaillancourt, J. P. et al.** (1996). Cleavage of huntingtin by apopain, a proapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract. *Nat Genet* **13**, 442-9.
- Gottlinger, H. G.** (2007). How HIV-1 hijacks ALIX. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 254-6.
- Gotz, R., Koster, R., Winkler, C., Raulf, F., Lottspeich, F., Scharl, M. and Thoenen, H.** (1994). Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature* **372**, 266-9.
- Gould, T. W., Burek, M. J., Sosnowski, J. M., Prevette, D. and Oppenheim, R. W.** (1999). The spatial-temporal gradient of naturally occurring motoneuron death reflects the time of prior exit from the cell cycle and position within the lateral motor column. *Dev Biol* **216**, 611-21.
- Grell, M., Zimmermann, G., Gottfried, E., Chen, C. M., Grunwald, U., Huang, D. C., Wu Lee, Y. H., Durkop, H., Engelmann, H., Scheurich, P. et al.** (1999). Induction of cell death by tumour necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40 and CD30: a role for TNF-R1 activation by endogenous membrane-anchored TNF. *Embo J* **18**, 3034-43.
- Gruenberg, J. and Stenmark, H.** (2004). The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 317-23.
- Guarin, E., Seuret, P., Nef, S., de Bilbao, F., Nef, P. and Dubois-Dauphin, M.** (1999). csp32 messenger RNA neosynthesis is induced by fatal axotomy and is not regulated by athanatal Bcl-2 over-expression. *Neuroscience* **90**, 653-64.
- Gulbins, E.** (2003). Regulation of death receptor signaling and apoptosis by ceramide. *Pharmacol Res* **47**, 393-9.

## H

- Hakem, R., Hakem, A., Duncan, G. S., Henderson, J. T., Woo, M., Soengas, M. S., Elia, A., de la Pompa, J. L., Kagi, D., Khoo, W. et al.** (1998). Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell* **94**, 339-52.
- Hall, D. H., Gu, G., Garcia-Anoveros, J., Gong, L., Chalfie, M. and Driscoll, M.** (1997). Neuropathology of degenerative cell death in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* **17**, 1033-45.
- Hamburger, V.** (1975). Cell death in the development of the lateral motor column of the chick embryo. *J Comp Neurol* **160**, 535-46.
- Hamburger, V.** (1992). History of the discovery of neuronal death in embryos. *J Neurobiol* **23**, 1116-23.
- Hamburger, V., Brunso-Bechtold, J. K. and Yip, J. W.** (1981). Neuronal death in the spinal ganglia of the chick embryo and its reduction by nerve growth factor. *J Neurosci* **1**, 60-71.
- Hammond, E. M., Brunet, C. L., Johnson, G. D., Parkhill, J., Milner, A. E., Brady, G., Gregory, C. D. and Grand, R. J.** (1998). Homology between a human apoptosis specific protein and the product of APG5, a gene involved in autophagy in yeast. *FEBS Lett* **425**, 391-5.
- Han, D. K., Chaudhary, P. M., Wright, M. E., Friedman, C., Trask, B. J., Riedel, R. T., Baskin, D. G., Schwartz, S. M. and Hood, L.** (1997). MRIT, a novel death-effector domain-containing protein, interacts with caspases and BclXL and initiates cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 11333-8.
- Harada, C., Harada, T., Nakamura, K., Sakai, Y., Tanaka, K. and Parada, L. F.** (2006). Effect of p75NTR on the regulation of naturally occurring cell death and retinal ganglion cell number in the mouse eye. *Dev Biol* **290**, 57-65.
- Harper, N., Hughes, M., MacFarlane, M. and Cohen, G. M.** (2003). Fas-associated death domain protein and caspase-8 are not recruited to the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex during tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J Biol Chem* **278**, 25534-41.
- Hartmann, A., Mouatt-Prigent, A., Faucheux, B. A., Agid, Y. and Hirsch, E. C.** (2002). FADD: A link between TNF family receptors and caspases in Parkinson's disease. *Neurology* **58**, 308-10.
- Hemming, F. J., Fraboulet, S., Blot, B. and Sadoul, R.** (2004). Early increase of apoptosis-linked gene-2 interacting protein X in areas of kainate-induced neurodegeneration. *Neuroscience* **123**, 887-95.
- Henderson, C. E., Camu, W., Mettling, C., Gouin, A., Poulsen, K., Karihaloo, M., Rullamas, J., Evans, T., McMahon, S. B., Armanini, M. P. et al.** (1993). Neurotrophins promote motor neuron survival and are present in embryonic limb bud. *Nature* **363**, 266-70.
- Henderson, C. E., Yamamoto, Y., Livet, J., Arce, V., Garces, A. and deLapeyriere, O.** (1998). Role of neurotrophic factors in motoneuron development. *J Physiol Paris* **92**, 279-81.
- Henkart, P. A.** (1996). ICE family proteases: mediators of all apoptotic cell death? *Immunity* **4**, 195-201.

- Hirsch, T., Marchetti, P., Susin, S. A., Dallaporta, B., Zamzami, N., Marzo, I., Geuskens, M. and Kroemer, G.** (1997). The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene* **15**, 1573-81.
- Hoeller, D., Crosetto, N., Blagoev, B., Raiborg, C., Tikkanen, R., Wagner, S., Kowanetz, K., Breitling, R., Mann, M., Stenmark, H. et al.** (2006). Regulation of ubiquitin-binding proteins by monoubiquitination. *Nat Cell Biol* **8**, 163-9.
- Hofmann, K., Bucher, P. and Tschopp, J.** (1997). The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem Sci* **22**, 155-6.
- Hollyday, M. and Hamburger, V.** (1976). Reduction of the naturally occurring motor neuron loss by enlargement of the periphery. *J Comp Neurol* **170**, 311-20.
- Hollyday, M., Hamburger, V. and Farris, J. M.** (1977). Localization of motor neuron pools supplying identified muscles in normal and supernumerary legs of chick embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 3582-6.
- Homma, S., Yaginuma, H. and Oppenheim, R. W.** (1994). Programmed cell death during the earliest stages of spinal cord development in the chick embryo: a possible means of early phenotypic selection. *J Comp Neurol* **345**, 377-95.
- Hong, G. S. and Jung, Y. K.** (2002). Caspase recruitment domain (CARD) as a bi-functional switch of caspase regulation and NF-kappaB signals. *J Biochem Mol Biol* **35**, 19-23.
- Horvitz, H. R.** (1999). Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res* **59**, 1701s-1706s.
- Hsu, H., Huang, J., Shu, H. B., Baichwal, V. and Goeddel, D. V.** (1996a). TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* **4**, 387-96.
- Hsu, H., Shu, H. B., Pan, M. G. and Goeddel, D. V.** (1996b). TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* **84**, 299-308.
- Hsu, H., Xiong, J. and Goeddel, D. V.** (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* **81**, 495-504.
- Hsu, Y. T., Wolter, K. G. and Youle, R. J.** (1997). Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3668-72.
- Hu, S., Vincenz, C., Ni, J., Gentz, R. and Dixit, V. M.** (1997). I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis. *J Biol Chem* **272**, 17255-7.
- Huang, H., Joazeiro, C. A., Bonfoco, E., Kamada, S., Leverson, J. D. and Hunter, T.** (2000). The inhibitor of apoptosis, cIAP2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes in vitro monoubiquitination of caspases 3 and 7. *J Biol Chem* **275**, 26661-4.
- Huttner, W. B. and Schmidt, A.** (2000). Lipids, lipid modification and lipid-protein interaction in membrane budding and fission--insights from the roles of endophilin A1 and synaptophysin in synaptic vesicle endocytosis. *Curr Opin Neurobiol* **10**, 543-51.
- Hwang, I. S., Jung, Y. S. and Kim, E.** (2002). Interaction of ALG-2 with ASK1 influences ASK1 localization and subsequent JNK activation. *FEBS Lett* **529**, 183-7.
- Inohara, N., Koseki, T., Hu, Y., Chen, S. and Nunez, G.** (1997). CLARP, a death effector domain-containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 10717-22.

## I

- Ingham, R. J., Gish, G. and Pawson, T.** (2004). The Nedd4 family of E3 ubiquitin ligases: functional diversity within a common modular architecture. *Oncogene* **23**, 1972-84.
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J. L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C. et al.** (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* **388**, 190-5.
- Itoh, N., Tsujimoto, Y. and Nagata, S.** (1993). Effect of bcl-2 on Fas antigen-mediated cell death. *J Immunol* **151**, 621-7.

## J

- Jang, I. K., Hu, R., Lacana, E., D'Adamio, L. and Gu, H.** (2002). Apoptosis-linked gene 2-deficient mice exhibit normal T-cell development and function. *Mol Cell Biol* **22**, 4094-100.
- Janicke, R. U., Sprengart, M. L., Wati, M. R. and Porter, A. G.** (1998). Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem* **273**, 9357-60.
- Jia, J., Tarabykina, S., Hansen, C., Berchtold, M. and Cygler, M.** (2001). Structure of apoptosis-linked protein ALG-2: insights into Ca<sup>2+</sup>-induced changes in penta-EF-hand proteins. *Structure* **9**, 267-75.
- Jones, S. J., Ledgerwood, E. C., Prins, J. B., Galbraith, J., Johnson, D. R., Pober, J. S. and Bradley, J. R.** (1999). TNF recruits TRADD to the plasma membrane but not the trans-Golgi network, the principal subcellular location of TNF-R1. *J Immunol* **162**, 1042-8.
- Jurgensmeier, J. M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D. and Reed, J. C.** (1998). Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 4997-5002.

## K

- Karin, M. and Lin, A.** (2002). NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* **3**, 221-7.
- Kataoka, T., Budd, R. C., Holler, N., Thome, M., Martinon, F., Irmeler, M., Burns, K., Hahne, M., Kennedy, N., Kovacovics, M. et al.** (2000). The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF-kappaB and Erk signaling pathways. *Curr Biol* **10**, 640-8.
- Katoh, K., Shibata, H., Suzuki, H., Nara, A., Ishidoh, K., Kominami, E., Yoshimori, T. and Maki, M.** (2003). The ALG-2-interacting protein Alix associates with CHMP4b, a human homologue of yeast Snf7 that is involved in multivesicular body sorting. *J Biol Chem* **278**, 39104-13.
- Katzmann, D. J., Babst, M. and Emr, S. D.** (2001). Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* **106**, 145-55.
- Katzmann, D. J., Odorizzi, G. and Emr, S. D.** (2002). Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 893-905.
- Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N. E. and Poirier, G. G.** (1993). Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* **53**, 3976-85.
- Kelekar, A., Chang, B. S., Harlan, J. E., Fesik, S. W. and Thompson, C. B.** (1997). Bad is a BH3 domain-containing protein that forms an inactivating dimer with Bcl-XL. *Mol Cell Biol* **17**, 7040-6.
- Kelekar, A. and Thompson, C. B.** (1998). Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol* **8**, 324-30.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. and Currie, A. R.** (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239-57.
- Kihara, A., Kabeya, Y., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T.** (2001). Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO Rep* **2**, 330-5.
- Kim, G. M., Xu, J., Xu, J., Song, S. K., Yan, P., Ku, G., Xu, X. M. and Hsu, C. Y.** (2001). Tumor necrosis factor receptor deletion reduces nuclear factor-kappaB activation, cellular inhibitor of apoptosis protein 2 expression, and functional recovery after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci* **21**, 6617-25.
- Kim, T. W., Pettingell, W. H., Jung, Y. K., Kovacs, D. M. and Tanzi, R. E.** (1997). Alternative cleavage of Alzheimer-associated presenilins during apoptosis by a caspase-3 family protease. *Science* **277**, 373-6.
- Kirisako, T., Baba, M., Ishihara, N., Miyazawa, K., Ohsumi, M., Yoshimori, T., Noda, T. and Ohsumi, Y.** (1999). Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *J Cell Biol* **147**, 435-46.
- Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Kramer, P. H. and Peter, M. E.** (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* **14**, 5579-88.
- Kischkel, F. C., Lawrence, D. A., Tinel, A., LeBlanc, H., Virmani, A., Schow, P., Gazdar, A., Blenis, J., Arnott, D. and Ashkenazi, A.** (2001). Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J Biol Chem* **276**, 46639-46.
- Klionsky, D. J., Cregg, J. M., Dunn, W. A., Jr., Emr, S. D., Sakai, Y., Sandoval, I. V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M. et al.** (2003). A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell* **5**, 539-45.
- Kluck, R. M., Bossy-Wetzell, E., Green, D. R. and Newmeyer, D. D.** (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* **275**, 1132-6.
- Kobayashi, T., Stang, E., Fang, K. S., de Moerloose, P., Parton, R. G. and Gruenberg, J.** (1998). A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature* **392**, 193-7.
- Komiyama, T., Ray, C. A., Pickup, D. J., Howard, A. D., Thornberry, N. A., Peterson, E. P. and Salvesen, G.** (1994). Inhibition of interleukin-1 beta converting enzyme by the cowpox virus serpin CrmA. An example of cross-class inhibition. *J Biol Chem* **269**, 19331-7.
- Kook, S., Shim, S. R., Choi, S. J., Ahn, J., Kim, J. I., Eom, S. H., Jung, Y. K., Paik, S. G. and Song, W. K.** (2000). Caspase-mediated cleavage of p130Cas in etoposide-induced apoptotic Rat-1 cells. *Mol Biol Cell* **11**, 929-39.
- Kovacovics, M., Martinon, F., Micheau, O., Bodmer, J. L., Hofmann, K. and Tschopp, J.** (2002). Overexpression of Helicard, a CARD-containing helicase cleaved during apoptosis, accelerates DNA degradation. *Curr Biol* **12**, 838-43.
- Krajewska, M., Wang, H. G., Krajewski, S., Zapata, J. M., Shabaik, A., Gascoyne, R. and Reed, J. C.** (1997). Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of CPP32 (Caspase-3), a cell death protease. *Cancer Res* **57**, 1605-13.
- Krajewski, S., Gascoyne, R. D., Zapata, J. M., Krajewska, M., Kitada, S., Chhanabhai, M., Horsman, D., Berean, K., Piro, L. D., Fugier-Vivier, I. et al.** (1997). Immunolocalization of the ICE/Ced-3-family protease, CPP32 (Caspase-3), in non-Hodgkin's lymphomas, chronic lymphocytic leukemias, and reactive lymph nodes. *Blood* **89**, 3817-25.
- Kreuz, S., Siegmund, D., Rumpf, J. J., Samel, D., Leverkus, M., Janssen, O., Hacker, G., Dittrich-Breiholz, O., Kracht, M., Scheurich, P. et al.** (2004). NFkappaB activation by Fas is mediated through FADD, caspase-8, and RIP and is inhibited by FLIP. *J Cell Biol* **166**, 369-80.
- Kroemer, G.** (1997). Mitochondrial implication in apoptosis. Towards an endosymbiont hypothesis of apoptosis evolution. *Cell Death Differ* **4**, 443-56.
- Kroemer, G., Dallaporta, B. and Resche-Rigon, M.** (1998). The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* **60**, 619-42.

- Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Krammer, P. H. and Kirchhoff, S.** (2001). Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* **276**, 20633-40.
- Kuan, C. Y., Roth, K. A., Flavell, R. A. and Rakic, P.** (2000). Mechanisms of programmed cell death in the developing brain. *Trends Neurosci* **23**, 291-7.
- Kuida, K., Zheng, T. S., Na, S., Kuan, C., Yang, D., Karasuyama, H., Rakic, P. and Flavell, R. A.** (1996). Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature* **384**, 368-72.
- Kumar, S. and Colussi, P. A.** (1999). Prodomains--adaptors--oligomerization: the pursuit of caspase activation in apoptosis. *Trends Biochem Sci* **24**, 1-4.

## L

- Lacana, E., Ganjei, J. K., Vito, P. and D'Adamio, L.** (1997). Dissociation of apoptosis and activation of IL-1beta-converting enzyme/Ced-3 proteases by ALG-2 and the truncated Alzheimer's gene ALG-3. *J Immunol* **158**, 5129-35.
- Lamb, T. M., Xu, W., Diamond, A. and Mitchell, A. P.** (2001). Alkaline response genes of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to the RIM101 pathway. *J Biol Chem* **276**, 1850-6.
- Lance-Jones, C. and Landmesser, L.** (1981). Pathway selection by embryonic chick motoneurons in an experimentally altered environment. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **214**, 19-52.
- Landmesser, L. T.** (2001). The acquisition of motoneuron subtype identity and motor circuit formation. *Int J Dev Neurosci* **19**, 175-82.
- Lane, J. D., Lucocq, J., Pryde, J., Barr, F. A., Woodman, P. G., Allan, V. J. and Lowe, M.** (2002). Caspase-mediated cleavage of the stacking protein GRASP65 is required for Golgi fragmentation during apoptosis. *J Cell Biol* **156**, 495-509.
- Lazebnik, Y. A., Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Poirier, G. G. and Earnshaw, W. C.** (1994). Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* **371**, 346-7.
- Lee, K. H., Feig, C., Tchikov, V., Schickel, R., Hallas, C., Schutze, S., Peter, M. E. and Chan, A. C.** (2006). The role of receptor internalization in CD95 signaling. *Embo J* **25**, 1009-23.
- Lee, N., MacDonald, H., Reinhard, C., Halenbeck, R., Roulston, A., Shi, T. and Williams, L. T.** (1997). Activation of hPAK65 by caspase cleavage induces some of the morphological and biochemical changes of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13642-7.
- Lee, S., Joshi, A., Nagashima, K., Freed, E. O. and Hurley, J. H.** (2007). Structural basis for viral late-domain binding to Alix. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 194-9.
- Lee, S. K. and Pfaff, S. L.** (2001). Transcriptional networks regulating neuronal identity in the developing spinal cord. *Nat Neurosci* **4 Suppl**, 1183-91.
- Leist, M. and Jaattela, M.** (2001). Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 589-98.
- Lenczowski, J. M., Dominguez, L., Eder, A. M., King, L. B., Zacharchuk, C. M. and Ashwell, J. D.** (1997). Lack of a role for Jun kinase and AP-1 in Fas-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* **17**, 170-81.
- Lennartsson, J., Wardega, P., Engstrom, U., Hellman, U. and Heldin, C. H.** (2006). Alix facilitates the interaction between c-Cbl and platelet-derived growth factor beta -receptor and thereby modulates receptor downregulation. *J Biol Chem*.
- Lens, S. M., Kataoka, T., Fortner, K. A., Tinel, A., Ferrero, I., MacDonald, R. H., Hahne, M., Beermann, F., Attinger, A., Orbea, H. A. et al.** (2002). The caspase 8 inhibitor c-FLIP(L) modulates T-cell receptor-induced proliferation but not activation-induced cell death of lymphocytes. *Mol Cell Biol* **22**, 5419-33.
- Lesay, A., Hickman, J. A. and Gibson, R. M.** (2001). Disruption of focal adhesions mediates detachment during neuronal apoptosis. *Neuroreport* **12**, 2111-5.
- Levade, T. and Jaffrezou, J. P.** (1999). Signalling sphingomyelinases: which, where, how and why? *Biochim Biophys Acta* **1438**, 1-17.
- Levi-Montalcini, R. and Hamburger, V.** (1951). Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J Exp Zool* **116**, 321-61.
- Levi-Montalcini, R., Meyer, H. and Hamburger, V.** (1954). In vitro experiments on the effects of mouse sarcomas 180 and 37 on the spinal and sympathetic ganglia of the chick embryo. *Cancer Res* **14**, 49-57.
- Levine, B. and Klionsky, D. J.** (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* **6**, 463-77.
- Lewin, G. R. and Barde, Y. A.** (1996). Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci* **19**, 289-317.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C. J. and Yuan, J.** (1998a). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**, 491-501.
- Li, L., Prevette, D., Oppenheim, R. W. and Milligan, C. E.** (1998b). Involvement of specific caspases in motoneuron cell death in vivo and in vitro following trophic factor deprivation. *Mol Cell Neurosci* **12**, 157-67.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S. and Wang, X.** (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**, 479-89.
- Li, Y., Kane, T., Tipper, C., Spatrick, P. and Jenness, D. D.** (1999a). Yeast mutants affecting possible quality control of plasma membrane proteins. *Mol Cell Biol* **19**, 3588-99.



- Li, Z. W., Chu, W., Hu, Y., Delhase, M., Deerinck, T., Ellisman, M., Johnson, R. and Karin, M.** (1999b). The IKKbeta subunit of IkkappaB kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis. *J Exp Med* **189**, 1839-45.
- Liepinsh, E., Ilag, L. L., Otting, G. and Ibanez, C. F.** (1997). NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *Embo J* **16**, 4999-5005.
- Lin, T., Genestier, L., Pinkoski, M. J., Castro, A., Nicholas, S., Mogil, R., Paris, F., Fuks, Z., Schuchman, E. H., Kolesnick, R. N. et al.** (2000). Role of acidic sphingomyelinase in Fas/CD95-mediated cell death. *J Biol Chem* **275**, 8657-63.
- Liston, P., Roy, N., Tamai, K., Lefebvre, C., Baird, S., Cherton-Horvat, G., Farahani, R., McLean, M., Ikeda, J. E., MacKenzie, A. et al.** (1996). Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* **379**, 349-53.
- Liu, Z. G., Hsu, H., Goeddel, D. V. and Karin, M.** (1996). Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell* **87**, 565-76.
- Locksley, R. M., Killeen, N. and Lenardo, M. J.** (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* **104**, 487-501.
- Loetscher, H., Pan, Y. C., Lahm, H. W., Gentz, R., Brockhaus, M., Tabuchi, H. and Lesslauer, W.** (1990). Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor. *Cell* **61**, 351-9.
- Losko, S., Kopp, F., Kranz, A. and Kolling, R.** (2001). Uptake of the ATP-binding cassette (ABC) transporter Ste6 into the yeast vacuole is blocked in the doa4 mutant. *Mol Biol Cell* **12**, 1047-59.
- Low, W., Smith, A., Ashworth, A. and Collins, M.** (1999). JNK activation is not required for Fas-mediated apoptosis. *Oncogene* **18**, 3737-41.
- Lucas, R., Juillard, P., Decoster, E., Redard, M., Burger, D., Donati, Y., Giroud, C., Monso-Hinard, C., De Kesel, T., Buurman, W. A. et al.** (1997). Crucial role of tumor necrosis factor (TNF) receptor 2 and membrane-bound TNF in experimental cerebral malaria. *Eur J Immunol* **27**, 1719-25.
- Luhtala, N. and Odorizzi, G.** (2004). Bro1 coordinates deubiquitination in the multivesicular body pathway by recruiting Doa4 to endosomes. *J Cell Biol* **166**, 717-29.
- Lumsden, A.** (1995). Neural development. A 'LIM code' for motor neurons? *Curr Biol* **5**, 491-5.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. and Wang, X.** (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94**, 481-90.

## M

- MacEwan, D. J.** (2002). TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Signal* **14**, 477-92.
- Maisonpierre, P. C., Belluscio, L., Squinto, S., Ip, N. Y., Furth, M. E., Lindsay, R. M. and Yancopoulos, G. D.** (1990). Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science* **247**, 1446-51.
- Maki, M., Kitaura, Y., Satoh, H., Ohkouchi, S. and Shibata, H.** (2002). Structures, functions and molecular evolution of the penta-EF-hand Ca<sup>2+</sup>-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* **1600**, 51-60.
- Malerod, L. and Stenmark, H.** (2007). ESCRTs. *Curr Biol* **17**, R42-3.
- Mancini, M., Machamer, C. E., Roy, S., Nicholson, D. W., Thornberry, N. A., Casciola-Rosen, L. A. and Rosen, A.** (2000). Caspase-2 is localized at the Golgi complex and cleaves golgin-160 during apoptosis. *J Cell Biol* **149**, 603-12.
- Mancini, M., Nicholson, D. W., Roy, S., Thornberry, N. A., Peterson, E. P., Casciola-Rosen, L. A. and Rosen, A.** (1998). The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling. *J Cell Biol* **140**, 1485-95.
- Marino, G. and Lopez-Otin, C.** (2004). Autophagy: molecular mechanisms, physiological functions and relevance in human pathology. *Cell Mol Life Sci* **61**, 1439-54.
- Martin-Serrano, J., Eastman, S. W., Chung, W. and Bieniasz, P. D.** (2005). HECT ubiquitin ligases link viral and cellular PPXY motifs to the vacuolar protein-sorting pathway. *J Cell Biol* **168**, 89-101.
- Martin-Serrano, J., Yarovoy, A., Perez-Caballero, D., Bieniasz, P. D., Strack, B., Calistri, A., Craig, S., Popova, E. and Gottlinger, H. G.** (2003a). Divergent retroviral late-budding domains recruit vacuolar protein sorting factors by using alternative adaptor proteins  
AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12414-9.
- Martin-Serrano, J., Zang, T. and Bieniasz, P. D.** (2003b). Role of ESCRT-I in retroviral budding. *J Virol* **77**, 4794-804.
- Martin-Villalba, A., Herr, I., Jeremias, I., Hahne, M., Brandt, R., Vogel, J., Schenkel, J., Herdegen, T. and Debatin, K. M.** (1999). CD95 ligand (Fas-L/APO-1L) and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediate ischemia-induced apoptosis in neurons. *J Neurosci* **19**, 3809-17.
- Martin, D. A., Siegel, R. M., Zheng, L. and Lenardo, M. J.** (1998). Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACHalpha1) death signal. *J Biol Chem* **273**, 4345-9.
- Martin, D. N. and Baehrecke, E. H.** (2004). Caspases function in autophagic programmed cell death in *Drosophila*. *Development* **131**, 275-84.

- Martinou, J. C., Dubois-Dauphin, M., Staple, J. K., Rodriguez, I., Frankowski, H., Missotten, M., Albertini, P., Talabot, D., Catsicas, S., Pietra, C. et al.** (1994). Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron* **13**, 1017-30.
- Martinou, J. C., Martinou, I. and Kato, A. C.** (1992). Cholinergic differentiation factor (CDF/LIF) promotes survival of isolated rat embryonic motoneurons in vitro. *Neuron* **8**, 737-44.
- Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Jurgensmeier, J. M., Susin, S. A., Vieira, H. L., Prevost, M. C., Xie, Z., Matsuyama, S., Reed, J. C. et al.** (1998). Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* **281**, 2027-31.
- Mashima, T., Naito, M., Noguchi, K., Miller, D. K., Nicholson, D. W. and Tsuruo, T.** (1997). Actin cleavage by CPP-32/apopain during the development of apoptosis. *Oncogene* **14**, 1007-12.
- Mathias, S., Pena, L. A. and Kolesnick, R. N.** (1998). Signal transduction of stress via ceramide. *Biochem J* **335** (Pt 3), 465-80.
- Matsuo, H., Chevallier, J., Mayran, N., Le Blanc, I., Ferguson, C., Faure, J., Blanc, N. S., Matile, S., Dubochet, J., Sadoul, R. et al.** (2004). Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. *Science* **303**, 531-4.
- Matsushita, K., Wu, Y., Qiu, J., Lang-Lazdunski, L., Hirt, L., Waeber, C., Hyman, B. T., Yuan, J. and Moskowitz, M. A.** (2000). Fas receptor and neuronal cell death after spinal cord ischemia. *J Neurosci* **20**, 6879-87.
- Mattei, S., Ryves, W. J., Blot, B., Sadoul, R., Harwood, A. J., Satre, M., Klein, G. and Aubry, L.** (2005). Dd-Alix, a conserved endosome-associated protein, controls Dictyostelium development. *Dev Biol* **279**, 99-113.
- Mattei, S., Klein, G., Satre, M. and Aubry, L.** (2006). Trafficking and developmental signaling: Alix at the crossroads. *Eur J Cell Biol*.
- McCarthy, M. J., Rubin, L. L. and Philpott, K. L.** (1997a). Involvement of caspases in sympathetic neuron apoptosis. *J Cell Sci* **110** (Pt 18), 2165-73.
- McCarthy, N. J., Whyte, M. K., Gilbert, C. S. and Evan, G. I.** (1997b). Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak. *J Cell Biol* **136**, 215-27.
- McFarlane, S. M., Pashmi, G., Connell, M. C., Littlejohn, A. F., Tucker, S. J., Vandenabeele, P. and MacEwan, D. J.** (2002). Differential activation of nuclear factor-kappaB by tumour necrosis factor receptor subtypes. TNFR1 predominates whereas TNFR2 activates transcription poorly. *FEBS Lett* **515**, 119-26.
- Messmer, U. K., Briner, V. A. and Pfeilschifter, J.** (2000). Basic fibroblast growth factor selectively enhances TNF-alpha-induced apoptotic cell death in glomerular endothelial cells: effects on apoptotic signaling pathways. *J Am Soc Nephrol* **11**, 2199-211.
- Mettling, C., Gouin, A., Robinson, M., el M'Hamdi, H., Camu, W., Bloch-Gallego, E., Buisson, B., Tanaka, H., Davies, A. M. and Henderson, C. E.** (1995). Survival of newly postmitotic motoneurons is transiently independent of exogenous trophic support. *J Neurosci* **15**, 3128-37.
- Micheau, O., Tschopp, J., Bodmer, J. L. and Schneider, P.** (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* **114**, 181-90.
- Milligan, C. E., Prevette, D., Yaginuma, H., Homma, S., Cardwell, C., Fritz, L. C., Tomaselli, K. J., Oppenheim, R. W. and Schwartz, L. M.** (1995). Peptide inhibitors of the ICE protease family arrest programmed cell death of motoneurons in vivo and in vitro. *Neuron* **15**, 385-93.
- Mills, J. C., Lee, V. M. and Pittman, R. N.** (1998). Activation of a PP2A-like phosphatase and dephosphorylation of tau protein characterize onset of the execution phase of apoptosis. *J Cell Sci* **111** (Pt 5), 625-36.
- Missotten, M., Nichols, A., Rieger, K. and Sadoul, R.** (1999). Alix, a novel mouse protein undergoing calcium-dependent interaction with the apoptosis-linked-gene 2 (ALG-2) protein. *Cell Death Differ* **6**, 124-9.
- Mollerup, J., Krogh, T. N., Nielsen, P. F. and Berchtold, M. W.** (2003). Properties of the co-chaperone protein p23 erroneously attributed to ALG-2 (apoptosis-linked gene 2). *FEBS Lett* **555**, 478-82.
- Monney, L., Otter, I., Olivier, R., Ozer, H. L., Haas, A. L., Omura, S. and Borner, C.** (1998). Defects in the ubiquitin pathway induce caspase-independent apoptosis blocked by Bcl-2. *J Biol Chem* **273**, 6121-31.
- Moynagh, P. N.** (2005). The NF-kappaB pathway. *J Cell Sci* **118**, 4589-92.
- Mukherjee, A. K., Ghosal, S. K. and Maity, C. R.** (1997). Lysosomal membrane stabilization by alpha-tocopherol against the damaging action of Vipera russelli venom phospholipase A2. *Cell Mol Life Sci* **53**, 152-5.
- Munshi, U. M., Kim, J., Nagashima, K., Hurley, J. H. and Freed, E. O.** (2007). An Alix fragment potently inhibits HIV-1 budding: Characterization of binding to retroviral YPX late domains. *J Biol Chem* **282**, 3847-55.
- Muzio, M., Chinnaiyan, A. M., Kischkel, F. C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J. D., Zhang, M., Gentz, R. et al.** (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* **85**, 817-27.
- Muzio, M., Salvesen, G. S. and Dixit, V. M.** (1997). FLICE induced apoptosis in a cell-free system. Cleavage of caspase zymogens. *J Biol Chem* **272**, 2952-6.
- Muzio, M., Stockwell, B. R., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S. and Dixit, V. M.** (1998). An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* **273**, 2926-30.

- Nagata, S.** (1997). Apoptosis by death factor. *Cell* **88**, 355-65.
- Nagata, S.** (2000). Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* **256**, 12-8.
- Naismith, J. H., Devine, T. Q., Kohno, T. and Sprang, S. R.** (1996). Structures of the extracellular domain of the type I tumor necrosis factor receptor. *Structure* **4**, 1251-62.
- Narita, T., Nishimura, T., Yoshizaki, K. and Taniyama, T.** (2005). CIN85 associates with TNF receptor 1 via Src and modulates TNF-alpha-induced apoptosis. *Exp Cell Res* **304**, 256-64.
- Neumeyer, J., Hallas, C., Merkel, O., Winoto-Morbach, S., Jakob, M., Thon, L., Adam, D., Schneider-Brachert, W. and Schutze, S.** (2006). TNF-receptor I defective in internalization allows for cell death through activation of neutral sphingomyelinase. *Exp Cell Res* **312**, 2142-53.
- Ng, F. W., Nguyen, M., Kwan, T., Branton, P. E., Nicholson, D. W., Cromlish, J. A. and Shore, G. C.** (1997). p28 Bap31, a Bcl-2/Bcl-XL- and procaspase-8-associated protein in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **139**, 327-38.
- Nguyen, M., Millar, D. G., Yong, V. W., Korsmeyer, S. J. and Shore, G. C.** (1993). Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *J Biol Chem* **268**, 25265-8.
- Nicholson, D. W.** (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* **6**, 1028-42.
- Nicholson, D. W., Ali, A., Thornberry, N. A., Vaillancourt, J. P., Ding, C. K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P. R., Labelle, M., Lazebnik, Y. A. et al.** (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* **376**, 37-43.
- Nikko, E., Marini, A. M. and Andre, B.** (2003). Permease recycling and ubiquitination status reveal a particular role for Bro1 in the multivesicular body pathway. *J Biol Chem* **278**, 50732-43.
- Nikko, E. and Andre, B.** (2007). The split-ubiquitin two-hybrid assay to analyze protein-protein interactions at the endosome: application to yeast Bro1 interacting with ESCRT complexes, the Doa4 ubiquitin hydrolase and the Rsp5 ubiquitin ligase. *Eukaryot Cell*.

## O

- O'Connor, T. M. and Wyttenbach, C. R.** (1974). Cell death in the embryonic chick spinal cord. *J Cell Biol* **60**, 448-59.
- Odorizzi, G.** (2006). The multiple personalities of Alix. *J Cell Sci* **119**, 3025-32.
- Oehm, A., Behrmann, I., Falk, W., Pawlita, M., Maier, G., Klas, C., Li-Weber, M., Richards, S., Dhein, J., Trauth, B. C. et al.** (1992). Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J Biol Chem* **267**, 10709-15.
- Oltvai, Z. N., Milliman, C. L. and Korsmeyer, S. J.** (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**, 609-19.
- Oppenheim, R. W.** (1991). Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* **14**, 453-501.
- Oppenheim, R. W.** (1996). Neurotrophic survival molecules for motoneurons: an embarrassment of riches. *Neuron* **17**, 195-7.
- Oppenheim, R. W., Chu-Wang, I. W. and Maderdrut, J. L.** (1978). Cell death of motoneurons in the chick embryo spinal cord. III. The differentiation of motoneurons prior to their induced degeneration following limb-bud removal. *J Comp Neurol* **177**, 87-111.
- Oppenheim, R. W., Flavell, R. A., Vinsant, S., Prevette, D., Kuan, C. Y. and Rakic, P.** (2001). Programmed cell death of developing mammalian neurons after genetic deletion of caspases. *J Neurosci* **21**, 4752-60.
- Oppenheim, R. W., Yin, Q. W., Prevette, D. and Yan, Q.** (1992). Brain-derived neurotrophic factor rescues developing avian motoneurons from cell death. *Nature* **360**, 755-7.
- Otomo, A., Hadano, S., Okada, T., Mizumura, H., Kunita, R., Nishijima, H., Showguchi-Miyata, J., Yanagisawa, Y., Kohiki, E., Suga, E. et al.** (2003). ALS2, a novel guanine nucleotide exchange factor for the small GTPase Rab5, is implicated in endosomal dynamics. *Hum Mol Genet* **12**, 1671-87.

## P

- Palumbo, G. J., Pickup, D. J., Fredrickson, T. N., McIntyre, L. J. and Buller, R. M.** (1989). Inhibition of an inflammatory response is mediated by a 38-kDa protein of cowpox virus. *Virology* **172**, 262-73.
- Pan, G., Ni, J., Wei, Y. F., Yu, G., Gentz, R. and Dixit, V. M.** (1997). An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* **277**, 815-8.
- Pan, G., Bauer, J. H., Haridas, V., Wang, S., Liu, D., Yu, G., Vincenz, C., Aggarwal, B. B., Ni, J. and Dixit, V. M.** (1998). Identification and functional characterization of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor. *FEBS Lett* **431**, 351-6.

- Pan, S., Wang, R., Zhou, X., He, G., Koomen, J., Kobayashi, R., Sun, L., Corvera, J., Gallick, G. E. and Kuang, J.** (2006). Involvement of the conserved adaptor protein Alix in actin cytoskeleton assembly. *J Biol Chem* **281**, 34640-50.
- Papa, S., Zazzeroni, F., Pham, C. G., Bubici, C. and Franzoso, G.** (2004). Linking JNK signaling to NF-kappaB: a key to survival. *J Cell Sci* **117**, 5197-208.
- Park, C., Sakamaki, K., Tachibana, O., Yamashima, T., Yamashita, J. and Yonehara, S.** (1998). Expression of fas antigen in the normal mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun* **252**, 623-8.
- Patel, T., Gores, G. J. and Kaufmann, S. H.** (1996). The role of proteases during apoptosis. *Faseb J* **10**, 587-97.
- Pattingre, S. and Levine, B.** (2006). Bcl-2 inhibition of autophagy: a new route to cancer? *Cancer Res* **66**, 2885-8.
- Petersen, A., Larsen, K. E., Behr, G. G., Romero, N., Przedborski, S., Brundin, P. and Sulzer, D.** (2001). Expanded CAG repeats in exon 1 of the Huntington's disease gene stimulate dopamine-mediated striatal neuron autophagy and degeneration. *Hum Mol Genet* **10**, 1243-54.
- Petiot, A., Pattingre, S., Arico, S., Meley, D. and Codogno, P.** (2002). Diversity of signaling controls of macroautophagy in mammalian cells. *Cell Struct Funct* **27**, 431-41.
- Petrelli, A., Gilestro, G. F., Lanzardo, S., Comoglio, P. M., Migone, N. and Giordano, S.** (2002). The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met. *Nature* **416**, 187-90.
- Pinkoski, M. J. and Green, D. R.** (1999). Fas ligand, death gene. *Cell Death Differ* **6**, 1174-81.

## Q

- Qin, Z. H., Wang, Y., Kikly, K. K., Sapp, E., Kegel, K. B., Aronin, N. and DiFiglia, M.** (2001). Pro-caspase-8 is predominantly localized in mitochondria and released into cytoplasm upon apoptotic stimulation. *J Biol Chem* **276**, 8079-86.

## R

- Raiborg, C., Rusten, T. E. and Stenmark, H.** (2003). Protein sorting into multivesicular endosomes. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 446-55.
- Rajcan-Separovic, E., Liston, P., Lefebvre, C. and Korneluk, R. G.** (1996). Assignment of human inhibitor of apoptosis protein (IAP) genes xiap, hiap-1, and hiap-2 to chromosomes Xq25 and 11q22-q23 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* **37**, 404-6.
- Rao, R. V., Poksay, K. S., Castro-Obregon, S., Schilling, B., Row, R. H., del Rio, G., Gibson, B. W., Ellerby, H. M. and Bredeken, D. E.** (2004). Molecular components of a cell death pathway activated by endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* **279**, 177-87.
- Raoul, C., Barthelemy, C., Couzinet, A., Hancock, D., Pettmann, B. and Hueber, A. O.** (2005). Expression of a dominant negative form of Daxx in vivo rescues motoneurons from Fas (CD95)-induced cell death. *J Neurobiol* **62**, 178-88.
- Raoul, C., Henderson, C. E. and Pettmann, B.** (1999). Programmed cell death of embryonic motoneurons triggered through the Fas death receptor. *J Cell Biol* **147**, 1049-62.
- Raoul, C., Pettmann, B. and Henderson, C. E.** (2000). Active killing of neurons during development and following stress: a role for p75(NTR) and Fas? *Curr Opin Neurobiol* **10**, 111-7.
- Rasper, D. M., Vaillancourt, J. P., Hadano, S., Houtzager, V. M., Seiden, I., Keen, S. L., Tawa, P., Xanthoudakis, S., Nasir, J., Martindale, D. et al.** (1998). Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex. *Cell Death Differ* **5**, 271-88.
- Ravi, R., Bedi, A., Fuchs, E. J. and Bedi, A.** (1998). CD95 (Fas)-induced caspase-mediated proteolysis of NF-kappaB. *Cancer Res* **58**, 882-6.
- Reid, E., Connell, J., Edwards, T. L., Duley, S., Brown, S. E. and Sanderson, C. M.** (2005). The hereditary spastic paraplegia protein spastin interacts with the ESCRT-III complex-associated endosomal protein CHMP1B. *Hum Mol Genet* **14**, 19-38.
- Reimann-Philipp, U., Ovase, R., Weigel, P. H. and Grammas, P.** (2001). Mechanisms of cell death in primary cortical neurons and PC12 cells. *J Neurosci Res* **64**, 654-60.
- Robertson, J., Beaulieu, J. M., Doroudchi, M. M., Durham, H. D., Julien, J. P. and Mushynski, W. E.** (2001). Apoptotic death of neurons exhibiting peripherin aggregates is mediated by the proinflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha. *J Cell Biol* **155**, 217-26.
- Rochat-Steiner, V., Becker, K., Micheau, O., Schneider, P., Burns, K. and Tschoopp, J.** (2000). FIST/HIPK3: a Fas/FADD-interacting serine/threonine kinase that induces FADD phosphorylation and inhibits fas-mediated Jun NH(2)-terminal kinase activation. *J Exp Med* **192**, 1165-74.
- Rodriguez, J. and Lazebnik, Y.** (1999). Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev* **13**, 3179-84.
- Roelink, H., Augsburger, A., Heemskerk, J., Korzh, V., Norlin, S., Ruiz i Altaba, A., Tanabe, Y., Placzek, M., Edlund, T., Jessell, T. M. et al.** (1994). Floor plate and motor neuron induction by vhh-1, a vertebrate homolog of hedgehog expressed by the notochord. *Cell* **76**, 761-75.

- Roelink, H., Porter, J. A., Chiang, C., Tanabe, Y., Chang, D. T., Beachy, P. A. and Jessell, T. M.** (1995). Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell* **81**, 445-55.
- Rosenbaum, D. M., Gupta, G., D'Amore, J., Singh, M., Weidenheim, K., Zhang, H. and Kessler, J. A.** (2000). Fas (CD95/APO-1) plays a role in the pathophysiology of focal cerebral ischemia. *J Neurosci Res* **61**, 686-92.
- Rothe, M., Pan, M. G., Henzel, W. J., Ayres, T. M. and Goeddel, D. V.** (1995). The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* **83**, 1243-52.
- Rothe, M., Wong, S. C., Henzel, W. J. and Goeddel, D. V.** (1994). A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* **78**, 681-92.
- Rotonda, J., Nicholson, D. W., Fazil, K. M., Gallant, M., Gareau, Y., Labelle, M., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Ruel, R., Vaillancourt, J. P. et al.** (1996). The three-dimensional structure of apopain/ CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat Struct Biol* **3**, 619-25.
- Roy, N., Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S. and Reed, J. C.** (1997). The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *Embo J* **16**, 6914-25.

**S**

- Sabapathy, K., Hu, Y., Kallunki, T., Schreiber, M., David, J. P., Jochum, W., Wagner, E. F. and Karin, M.** (1999). JNK2 is required for efficient T-cell activation and apoptosis but not for normal lymphocyte development. *Curr Biol* **9**, 116-25.
- Sadoul, R.** (2006). Do Alix and ALG-2 really control endosomes for better or for worse? *Biol Cell* **98**, 69-77.
- Sahara, S., Aoto, M., Eguchi, Y., Imamoto, N., Yoneda, Y. and Tsujimoto, Y.** (1999). Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation. *Nature* **401**, 168-73.
- Sakahira, H., Enari, M. and Nagata, S.** (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* **391**, 96-9.
- Sakurai, M., Hayashi, T., Abe, K., Sadahiro, M. and Tabayashi, K.** (1998). Delayed selective motor neuron death and fas antigen induction after spinal cord ischemia in rabbits. *Brain Res* **797**, 23-8.
- Salvesen, G. S.** (1999). Caspase 8: igniting the death machine. *Structure* **7**, R225-9.
- Sato, N., Sakuma, C., Sato, Y., Gould, T. W., Oppenheim, R. W. and Yaginuma, H.** (2006). Distinct susceptibility of developing neurons to death following Bax overexpression in the chicken embryo. *Cell Death Differ* **13**, 435-45.
- Sattler, M., Liang, H., Nettlesheim, D., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Eberstadt, M., Yoon, H. S., Shuker, S. B., Chang, B. S., Minn, A. J. et al.** (1997). Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* **275**, 983-6.
- Scaffidi, C., Schmitz, I., Zha, J., Korsmeyer, S. J., Krammer, P. H. and Peter, M. E.** (1999). Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *J Biol Chem* **274**, 22532-8.
- Schall, T. J., Lewis, M., Koller, K. J., Lee, A., Rice, G. C., Wong, G. H., Gatanaga, T., Granger, G. A., Lentz, R., Raab, H. et al.** (1990). Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. *Cell* **61**, 361-70.
- Schweichel, J. U. and Merker, H. J.** (1973). The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* **7**, 253-66.
- Schlegel, R. A., Callahan, M. K. and Williamson, P.** (2000). The central role of phosphatidylserine in the phagocytosis of apoptotic thymocytes. *Ann N Y Acad Sci* **926**, 217-25.
- Schmidt, A., Wolde, M., Thiele, C., Fest, W., Kratzin, H., Podtelejnikov, A. V., Witke, W., Huttner, W. B. and Soling, H. D.** (1999). Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid. *Nature* **401**, 133-41.
- Schmidt, M. H., Chen, B., Randazzo, L. M. and Bogler, O.** (2003). SETA/CIN85/Ruk and its binding partner AIP1 associate with diverse cytoskeletal elements, including FAKs, and modulate cell adhesion. *J Cell Sci* **116**, 2845-55.
- Schmidt, M. H., Dikic, I. and Bogler, O.** (2005). Src phosphorylation of Alix/AIP1 modulates its interaction with binding partners and antagonizes its activities. *J Biol Chem* **280**, 3414-25.
- Schmidt, M. H., Hoeller, D., Yu, J., Furnari, F. B., Cavenee, W. K., Dikic, I. and Bogler, O.** (2004). Alix/AIP1 antagonizes epidermal growth factor receptor downregulation by the Cbl-SETA/CIN85 complex. *Mol Cell Biol* **24**, 8981-93.
- Schneider-Brachert, W., Tchikov, V., Neumeyer, J., Jakob, M., Winoto-Morbach, S., Held-Feindt, J., Heinrich, M., Merkel, O., Ehrenschwender, M., Adam, D. et al.** (2004). Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptors as death signaling vesicles. *Immunity* **21**, 415-28.
- Schutze, S., Machleidt, T. and Kronke, M.** (1994). The role of diacylglycerol and ceramide in tumor necrosis factor and interleukin-1 signal transduction. *J Leukoc Biol* **56**, 533-41.
- Sedel, F., Bechade, C. and Triller, A.** (1999). Nerve growth factor (NGF) induces motoneuron apoptosis in rat embryonic spinal cord in vitro. *Eur J Neurosci* **11**, 3904-12.
- Sedel, F., Bechade, C., Vyas, S. and Triller, A.** (2004). Macrophage-derived tumor necrosis factor alpha, an early developmental signal for motoneuron death. *J Neurosci* **24**, 2236-46.
- Segui, B., Cuvillier, O., Adam-Klages, S., Garcia, V., Malagarie-Cazenave, S., Leveque, S., Caspar-Bauguil, S., Coudert, J., Salvayre, R., Kronke, M. et al.** (2001). Involvement of FAN in TNF-induced apoptosis. *J Clin Invest* **108**, 143-51.

- Segura-Morales, C., Pescia, C., Chatellard-Cause, C., Sadoul, R., Bertrand, E. and Basyuk, E. (2005). Tsg101 and Alix interact with murine leukemia virus Gag and cooperate with Nedd4 ubiquitin ligases during budding. *J Biol Chem* **280**, 27004-12.
- Sendtner, M., Gotz, R., Holtmann, B., Escary, J. L., Masu, Y., Carroll, P., Wolf, E., Brem, G., Brulet, P. and Thoenen, H. (1996). Cryptic physiological trophic support of motoneurons by LIF revealed by double gene targeting of CNTF and LIF. *Curr Biol* **6**, 686-94.
- Sendtner, M., Holtmann, B., Kolbeck, R., Thoenen, H. and Barde, Y. A. (1992). Brain-derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in newborn rats after nerve section. *Nature* **360**, 757-9.
- Shaulian, E. and Karin, M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* **4**, E131-6.
- Shaye, D. D. and Greenwald, I. (2005). LIN-12/Notch trafficking and regulation of DSL ligand activity during vulval induction in *Caenorhabditis elegans*. *Development* **132**, 5081-92.
- Sheehan, K. C., Pinckard, J. K., Arthur, C. D., Dehner, L. P., Goeddel, D. V. and Schreiber, R. D. (1995). Monoclonal antibodies specific for murine p55 and p75 tumor necrosis factor receptors: identification of a novel in vivo role for p75. *J Exp Med* **181**, 607-17.
- Sheff, D. R., Kroschewski, R. and Mellman, I. (2002). Actin dependence of polarized receptor recycling in Madin-Darby canine kidney cell endosomes. *Mol Biol Cell* **13**, 262-75.
- Shibata, H., Yamada, K., Mizuno, T., Yorikawa, C., Takahashi, H., Satoh, H., Kitaura, Y. and Maki, M. (2004). The penta-EF-hand protein ALG-2 interacts with a region containing PxY repeats in Alix/AIP1, which is required for the subcellular punctate distribution of the amino-terminal truncation form of Alix/AIP1. *J Biochem (Tokyo)* **135**, 117-28.
- Shirasaki, R. and Pfaff, S. L. (2002). Transcriptional codes and the control of neuronal identity. *Annu Rev Neurosci* **25**, 251-81.
- Shu, H. B., Halpin, D. R. and Goeddel, D. V. (1997). Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis. *Immunity* **6**, 751-63.
- Siegel, R. M., Frederiksen, J. K., Zacharias, D. A., Chan, F. K., Johnson, M., Lynch, D., Tsien, R. Y. and Lenardo, M. J. (2000). Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* **288**, 2354-7.
- Silverman, N. and Maniatis, T. (2001). NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev* **15**, 2321-42.
- Skibinski, G., Parkinson, N. J., Brown, J. M., Chakrabarti, L., Lloyd, S. L., Hummerich, H., Nielsen, J. E., Hodges, J. R., Spillantini, M. G., Thusgaard, T. et al. (2005). Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. *Nat Genet* **37**, 806-8.
- Slagsvold, T., Pattni, K., Malerod, L. and Stenmark, H. (2006). Endosomal and non-endosomal functions of ESCRT proteins. *Trends Cell Biol* **16**, 317-26.
- Slee, E. A., Harte, M. T., Kluck, R. M., Wolf, B. B., Casiano, C. A., Newmeyer, D. D., Wang, H. G., Reed, J. C., Nicholson, D. W., Alnemri, E. S. et al. (1999). Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* **144**, 281-92.
- Slepnev, V. I. and De Camilli, P. (2000). Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis. *Nat Rev Neurosci* **1**, 161-72.
- Smith, C. A., Farrah, T. and Goodwin, R. G. (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* **76**, 959-62.
- Snider, W. D. (1994). Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell* **77**, 627-38.
- Song, W. and Zinsmaier, K. E. (2003). Endophilin and synaptojanin hook up to promote synaptic vesicle endocytosis. *Neuron* **40**, 665-7.
- Soubeyran, P., Kowanetz, K., Szymkiewicz, I., Langdon, W. Y. and Dikic, I. (2002). Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors. *Nature* **416**, 183-7.
- Springael, J. Y., Nikko, E., Andre, B. and Marini, A. M. (2002). Yeast Npi3/Bro1 is involved in ubiquitin-dependent control of permease trafficking. *FEBS Lett* **517**, 103-9.
- Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T. and Alnemri, E. S. (1998). Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell* **1**, 949-57.
- Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Otilie, S., Bullrich, F., Banks, S., Wang, Y., Fernandes-Alnemri, T., Croce, C. M., Litwack, G., Tomaselli, K. J. et al. (1997). FLAME-1, a novel FADD-like anti-apoptotic molecule that regulates Fas/TNFR1-induced apoptosis. *J Biol Chem* **272**, 18542-5.
- Srinivasula, S. M., Fernandes-Alnemri, T., Zangrilli, J., Robertson, N., Armstrong, R. C., Wang, L., Trapani, J. A., Tomaselli, K. J., Litwack, G. and Alnemri, E. S. (1996). The Ced-3/interleukin 1beta converting enzyme-like homolog Mch6 and the lamin-cleaving enzyme Mch2alpha are substrates for the apoptotic mediator CPP32. *J Biol Chem* **271**, 27099-106.
- Srinivasula, S. M., Hegde, R., Saleh, A., Datta, P., Shiozaki, E., Chai, J., Lee, R. A., Robbins, P. D., Fernandes-Alnemri, T., Shi, Y. et al. (2001). A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* **410**, 112-6.
- Stanger, B. Z., Leder, P., Lee, T. H., Kim, E. and Seed, B. (1995). RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell* **81**, 513-23.
- Stennicke, H. R., Deveraux, Q. L., Humke, E. W., Reed, J. C., Dixit, V. M. and Salvesen, G. S. (1999). Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J Biol Chem* **274**, 8359-62.
- Stennicke, H. R., Jurgensmeier, J. M., Shin, H., Deveraux, Q., Wolf, B. B., Yang, X., Zhou, Q., Ellerby, H. M., Ellerby, L. M., Bredesen, D. et al. (1998). Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J Biol Chem* **273**, 27084-90.

- Storey, H., Stewart, A., Vandenabeele, P. and Luzio, J. P.** (2002). The p55 tumour necrosis factor receptor TNFR1 contains a trans-Golgi network localization signal in the C-terminal region of its cytoplasmic tail. *Biochem J* **366**, 15-22.
- Strack, B., Calistri, A., Craig, S., Popova, E. and Gottlinger, H. G.** (2003). AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and ELAV p9 functioning in virus budding. *Cell* **114**, 689-99.
- Subramanian, L., Crabb, J. W., Cox, J., Durussel, I., Walker, T. M., van Ginkel, P. R., Bhattacharya, S., Dellaria, J. M., Palczewski, K. and Polans, A. S.** (2004). Ca<sup>2+</sup> binding to EF hands 1 and 3 is essential for the interaction of apoptosis-linked gene-2 with Alix/AIP1 in ocular melanoma. *Biochemistry* **43**, 11175-86.
- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Brenner, C., Larochette, N., Prevost, M. C., Alzari, P. M. and Kroemer, G.** (1999a). Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med* **189**, 381-94.
- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M. et al.** (1999b). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**, 441-6.
- Susin, S. A., Zamzami, N., Castedo, M., Hirsch, T., Marchetti, P., Macho, A., Daugas, E., Geuskens, M. and Kroemer, G.** (1996). Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med* **184**, 1331-41.
- Szymkiewicz, I., Kowanetz, K., Soubeyran, P., Dinarina, A., Lipkowitz, S. and Dikic, I.** (2002). CIN85 participates in Cbl-b-mediated down-regulation of receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem* **277**, 39666-72.

**T**

- Takahashi, A. and Earnshaw, W. C.** (1996). ICE-related proteases in apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* **6**, 50-5.
- Takahashi, R., Deveraux, Q., Tamm, I., Welsh, K., Assa-Munt, N., Salvesen, G. S. and Reed, J. C.** (1998). A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J Biol Chem* **273**, 7787-90.
- Take, H., Watanabe, S., Takeda, K., Yu, Z. X., Iwata, N. and Kajigaya, S.** (2000). Cloning and characterization of a novel adaptor protein, CIN85, that interacts with c-Cbl. *Biochem Biophys Res Commun* **268**, 321-8.
- Tanabe, Y. and Jessell, T. M.** (1996). Diversity and pattern in the developing spinal cord. *Science* **274**, 1115-23.
- Tang, G., Minemoto, Y., Dibling, B., Purcell, N. H., Li, Z., Karin, M. and Lin, A.** (2001). Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes. *Nature* **414**, 313-7.
- Tarabykina, S., Moller, A. L., Durussel, I., Cox, J. and Berchtold, M. W.** (2000). Two forms of the apoptosis-linked protein ALG-2 with different Ca(2+) affinities and target recognition. *J Biol Chem* **275**, 10514-8.
- Tartaglia, L. A., Ayres, T. M., Wong, G. H. and Goeddel, D. V.** (1993a). A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* **74**, 845-53.
- Tartaglia, L. A. and Goeddel, D. V.** (1992). Tumor necrosis factor receptor signaling. A dominant negative mutation suppresses the activation of the 55-kDa tumor necrosis factor receptor. *J Biol Chem* **267**, 4304-7.
- Tartaglia, L. A., Goeddel, D. V., Reynolds, C., Figari, I. S., Weber, R. F., Fendly, B. M. and Palladino, M. A., Jr.** (1993b). Stimulation of human T-cell proliferation by specific activation of the 75-kDa tumor necrosis factor receptor. *J Immunol* **151**, 4637-41.
- Tepper, A. D., Ruurs, P., Borst, J. and van Blitterswijk, W. J.** (2001). Effect of overexpression of a neutral sphingomyelinase on CD95-induced ceramide production and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **280**, 634-9.
- Terwel, D. and van de Berg, W.** (2000). c-Jun/AP-1 (N) directed antibodies cross-react with "apoptosis-specific protein" which marks an autophagic process during neuronal apoptosis. *Neuroscience* **96**, 445-6.
- Tewari, M. and Dixit, V. M.** (1995). Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. *J Biol Chem* **270**, 3255-60.
- Thien, C. B. and Langdon, W. Y.** (2001). Cbl: many adaptations to regulate protein tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 294-307.
- Thome, M. and Tschopp, J.** (2001). Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nat Rev Immunol* **1**, 50-8.
- Thorburn, A.** (2004). Death receptor-induced cell killing. *Cell Signal* **16**, 139-44.
- Thornberry, N. A.** (1997). The caspase family of cysteine proteases. *Br Med Bull* **53**, 478-90.
- Thornberry, N. A.** (1998). Caspases: key mediators of apoptosis. *Chem Biol* **5**, R97-103.
- Thornberry, N. A., Bull, H. G., Calaycay, J. R., Chapman, K. T., Howard, A. D., Kostura, M. J., Miller, D. K., Molineaux, S. M., Weidner, J. R., Aunins, J. et al.** (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* **356**, 768-74.
- Thornberry, N. A. and Lazebnik, Y.** (1998). Caspases: enemies within. *Science* **281**, 1312-6.
- Timmer, J. C. and Salvesen, G. S.** (2007). Caspase substrates. *Cell Death Differ* **14**, 66-72.
- Tinel, A., Janssens, S., Lippens, S., Cuenin, S., Logette, E., Jaccard, B., Quadroni, M. and Tschopp, J.** (2007). Autoproteolysis of PIDD marks the bifurcation between pro-death caspase-2 and pro-survival NF-kappaB pathway. *Embo J* **26**, 197-208.
- Todd, I., Radford, P. M., Draper-Morgan, K. A., McIntosh, R., Bainbridge, S., Dickinson, P., Jamhawi, L., Sansaridis, M., Huggins, M. L., Tighe, P. J. et al.** (2004). Mutant forms of tumour necrosis factor receptor I that occur in TNF-receptor-associated periodic syndrome retain signalling functions but show abnormal behaviour. *Immunology* **113**, 65-79.

**Tosney, K. W., Hotary, K. B. and Lance-Jones, C.** (1995). Specifying the target identity of motoneurons. *Bioessays* **17**, 379-82.

**Treanor, J. J., Goodman, L., de Sauvage, F., Stone, D. M., Poulsen, K. T., Beck, C. D., Gray, C., Armanini, M. P., Pollock, R. A., Hefti, F. et al.** (1996). Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature* **382**, 80-3.

**Trioulier, Y., Torch, S., Blot, B., Cristina, N., Chatellard-Causse, C., Verna, J. M. and Sadoul, R.** (2004). Alix, a protein regulating endosomal trafficking, is involved in neuronal death. *J Biol Chem* **279**, 2046-52.

## U

**Ugolini, G., Raoul, C., Ferri, A., Haenggeli, C., Yamamoto, Y., Salaun, D., Henderson, C. E., Kato, A. C., Pettmann, B. and Hueber, A. O.** (2003). Fas/tumor necrosis factor receptor death signaling is required for axotomy-induced death of motoneurons in vivo

Programmed cell death of embryonic motoneurons triggered through the Fas death receptor. *J Neurosci* **23**, 8526-31.

## V

**van der Goot, F. G. and Gruenberg, J.** (2006). Intra-endosomal membrane traffic. *Trends Cell Biol* **16**, 514-21.

**Vander Heiden, M. G., Chandel, N. S., Williamson, E. K., Schumacker, P. T. and Thompson, C. B.** (1997). Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* **91**, 627-37.

**Varfolomeev, E. E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannilkulchai, N., Beckmann, J. S., Mett, I. L., Rebrikov, D., Brodianski, V. M., Kemper, O. C., Kollet, O. et al.** (1998). Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity* **9**, 267-76.

**Vaux, D. L., Cory, S. and Adams, J. M.** (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* **335**, 440-2.

**Vaux, D. L. and Silke, J.** (2005). IAPs, RINGs and ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 287-97.

**Veldman, R. J., Maestre, N., Aduib, O. M., Medin, J. A., Salvayre, R. and Levade, T.** (2001). A neutral sphingomyelinase resides in sphingolipid-enriched microdomains and is inhibited by the caveolin-scaffolding domain: potential implications in tumour necrosis factor signalling. *Biochem J* **355**, 859-68.

**Verhagen, A. M. and Vaux, D. L.** (2002). Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac. *Apoptosis* **7**, 163-6.

**Verstreken, P., Kjaerulff, O., Lloyd, T. E., Atkinson, R., Zhou, Y., Meinertzhagen, I. A. and Bellen, H. J.** (2002). Endophilin mutations block clathrin-mediated endocytosis but not neurotransmitter release. *Cell* **109**, 101-12.

**Vito, P., Lacana, E. and D'Adamio, L.** (1996). Interfering with apoptosis: Ca(2+)-binding protein ALG-2 and Alzheimer's disease gene ALG-3. *Science* **271**, 521-5.

**Vito, P., Pellegrini, L., Guiet, C. and D'Adamio, L.** (1999). Cloning of AIP1, a novel protein that associates with the apoptosis-linked gene ALG-2 in a Ca2+-dependent reaction. *J Biol Chem* **274**, 1533-40.

**von Schwedler, U. K., Stuchell, M., Muller, B., Ward, D. M., Chung, H. Y., Morita, E., Wang, H. E., Davis, T., He, G. P., Cimbara, D. M. et al.** (2003). The protein network of HIV budding. *Cell* **114**, 701-13.

## W

**Walczak, H. and Krammer, P. H.** (2000). The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp Cell Res* **256**, 58-66.

**Walker, N. P., Talanian, R. V., Brady, K. D., Dang, L. C., Bump, N. J., Ferez, C. R., Franklin, S., Ghayur, T., Hackett, M. C., Hammill, L. D. et al.** (1994). Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)<sub>2</sub> homodimer. *Cell* **78**, 343-52.

**Wang, C. W. and Klionsky, D. J.** (2003). The molecular mechanism of autophagy. *Mol Med* **9**, 65-76.

**Wang, H. and Tessier-Lavigne, M.** (1999). En passant neurotrophic action of an intermediate axonal target in the developing mammalian CNS. *Nature* **401**, 765-9.

**Weil, M., Jacobson, M. D., Coles, H. S., Davies, T. J., Gardner, R. L., Raff, K. D. and Raff, M. C.** (1996). Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. *J Cell Biol* **133**, 1053-9.

**Wen, L. P., Fahrni, J. A., Troie, S., Guan, J. L., Orth, K. and Rosen, G. D.** (1997). Cleavage of focal adhesion kinase by caspases during apoptosis. *J Biol Chem* **272**, 26056-61.

**White, E.** (1996). Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev* **10**, 1-15.

**White, F. A., Keller-Peck, C. R., Knudson, C. M., Korsmeyer, S. J. and Snider, W. D.** (1998). Widespread elimination of naturally occurring neuronal death in Bax-deficient mice. *J Neurosci* **18**, 1428-39.

**White, I. J., Bailey, L. M., Aghakhani, M. R., Moss, S. E. and Futter, C. E.** (2006). EGF stimulates annexin 1-dependent inward vesiculation in a multivesicular endosome subpopulation. *Embo J* **25**, 1-12.



- Widmann, C., Gibson, S. and Johnson, G. L.** (1998). Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals. *J Biol Chem* **273**, 7141-7.
- Wiese, S., Metzger, F., Holtmann, B. and Sendtner, M.** (1999). The role of p75NTR in modulating neurotrophin survival effects in developing motoneurons. *Eur J Neurosci* **11**, 1668-76.
- Wilson, K. P., Black, J. A., Thomson, J. A., Kim, E. E., Griffith, J. P., Navia, M. A., Murcko, M. A., Chambers, S. P., Aldape, R. A., Raybuck, S. A. et al.** (1994). Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature* **370**, 270-5.
- Woo, M., Hakem, R., Soengas, M. S., Duncan, G. S., Shahinian, A., Kagi, D., Hakem, A., McCurrach, M., Khoo, W., Kaufman, S. A. et al.** (1998). Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev* **12**, 806-19.
- Wride, M. A., Lapchak, P. H. and Sanders, E. J.** (1994). Distribution of TNF alpha-like proteins correlates with some regions of programmed cell death in the chick embryo. *Int J Dev Biol* **38**, 673-82.
- Wride, M. A. and Sanders, E. J.** (1993). Expression of tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha)-cross-reactive proteins during early chick embryo development. *Dev Dyn* **198**, 225-39.
- Wride, M. A. and Sanders, E. J.** (1995). Potential roles for tumour necrosis factor alpha during embryonic development. *Anat Embryol (Berl)* **191**, 1-10.
- Wu, G., Chai, J., Suber, T. L., Wu, J. W., Du, C., Wang, X. and Shi, Y.** (2000). Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature* **408**, 1008-12.
- Wu, Y., Pan, S., Che, S., He, G., Nelman-Gonzalez, M., Weil, M. M. and Kuang, J.** (2001). Overexpression of Hp95 induces G1 phase arrest in confluent HeLa cells. *Differentiation* **67**, 139-53.
- Wu, Y., Pan, S., Luo, W., Lin, S. H. and Kuang, J.** (2002). Hp95 promotes anoikis and inhibits tumorigenicity of HeLa cells. *Oncogene* **21**, 6801-8.

## X

- Xia, Z. P. and Chen, Z. J.** (2005). TRAF2: a double-edged sword? *Sci STKE* **2005**, pe7.
- Xiang, J., Chao, D. T. and Korsmeyer, S. J.** (1996). BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14559-63.
- Xu, W. and Mitchell, A. P.** (2001). Yeast PalA/AIP1/Alix homolog Rim20p associates with a PEST-like region and is required for its proteolytic cleavage. *J Bacteriol* **183**, 6917-23.
- Xue, L., Fletcher, G. C. and Tolkovsky, A. M.** (1999). Autophagy is activated by apoptotic signalling in sympathetic neurons: an alternative mechanism of death execution. *Mol Cell Neurosci* **14**, 180-98.

## Y

- Yaginuma, H., Sato, N., Homma, S. and Oppenheim, R. W.** (2001a). Roles of caspases in the programmed cell death of motoneurons in vivo. *Arch Histol Cytol* **64**, 461-74.
- Yaginuma, H., Shiraiwa, N., Shimada, T., Nishiyama, K., Hong, J., Wang, S., Momoi, T., Uchiyama, Y. and Oppenheim, R. W.** (2001b). Caspase activity is involved in, but is dispensable for, early motoneuron death in the chick embryo cervical spinal cord. *Mol Cell Neurosci* **18**, 168-82.
- Yaginuma, H., Tomita, M., Takashita, N., McKay, S. E., Cardwell, C., Yin, Q. W. and Oppenheim, R. W.** (1996). A novel type of programmed neuronal death in the cervical spinal cord of the chick embryo. *J Neurosci* **16**, 3685-703.
- Yamamoto, Y. and Henderson, C. E.** (1999). Patterns of programmed cell death in populations of developing spinal motoneurons in chicken, mouse, and rat. *Dev Biol* **214**, 60-71.
- Yan, Q., Matheson, C. and Lopez, O. T.** (1995). In vivo neurotrophic effects of GDNF on neonatal and adult facial motor neurons. *Nature* **373**, 341-4.
- Yang, E. and Korsmeyer, S. J.** (1996). Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* **88**, 386-401.
- Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J., Peng, T. I., Jones, D. P. and Wang, X.** (1997a). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* **275**, 1129-32.
- Yang, X., Khosravi-Far, R., Chang, H. Y. and Baltimore, D.** (1997b). Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell* **89**, 1067-76.
- Yang, X., Stennicke, H. R., Wang, B., Green, D. R., Janicke, R. U., Srinivasan, A., Seth, P., Salvesen, G. S. and Froelich, C. J.** (1998). Granzyme B mimics apical caspases. Description of a unified pathway for trans-activation of executioner caspase-3 and -7. *J Biol Chem* **273**, 34278-83.
- Ye, H., Cande, C., Stephanou, N. C., Jiang, S., Gurbuxani, S., Larochette, N., Daugas, E., Garrido, C., Kroemer, G. and Wu, H.** (2002). DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat Struct Biol* **9**, 680-4.

**Yi, X., Bouley, R., Lin, H. Y., Bechoua, S., Sun, T. X., Del Re, E., Shioda, T., Raychowdhury, M. K., Lu, H., Abou-Samra, A. B. et al.** (2007). Alix (Aip1) Is A Vasopressin Receptor (V2r) Interacting Protein That Increases Lysosomal Degradation Of The V2r. *Am J Physiol Renal Physiol*.

**Yu, L., Lenardo, M. J. and Baehrecke, E. H.** (2004). Autophagy and caspases: a new cell death program. *Cell Cycle* **3**, 1124-6.

**Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M. and Horvitz, H. R.** (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* **75**, 641-52.

## **Z**

**Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Hirsch, T., Susin, S. A., Masse, B. and Kroemer, G.** (1996). Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis. *FEBS Lett* **384**, 53-7.

**Zheng, T. S., Schlosser, S. F., Dao, T., Hingorani, R., Crispe, I. N., Boyer, J. L. and Flavell, R. A.** (1998). Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13618-23.

**Zhou, Q., Snipas, S., Orth, K., Muzio, M., Dixit, V. M. and Salvesen, G. S.** (1997). Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases. *J Biol Chem* **272**, 7797-800.

**Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A. and Wang, X.** (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* **90**, 405-13.

**Zou, H., Li, Y., Liu, X. and Wang, X.** (1999). An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* **274**, 11549-56.

**Zhou, P., Chou, J., Olea, R. S., Yuan, J. and Wagner, G.** (1999). Solution structure of Apaf-1 CARD and its interaction with caspase-9 CARD: a structural basis for specific adaptor/caspase interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11265-70.